Eleni Gomes

Produção de enzimas despolimerizantes de material vegetal com aplicação industrial

unesp

Eleni Gomes

PRODUÇÃO DE ENZIMAS DESPOLIMERIZANTES DE MATERIAL VEGETAL COM APLICAÇÃO INDUSTRIAL

1910001315

IBILCE/UNESP
São José do Rio Preto
JUNHO/2004

Gomes, Eleni.
Produção de enzimas despolimerizantes de material vegetal com aplicação industrial / Eleni Gomes – São José do Rio Preto : [s.n], 2004
287 f. : il.; 30 cm.

Texto (livre-docência) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Enzimas - Aplicações industriais. 2. Pectinase. 3. Amilases. 4. Xilanases. 5. Fermentação em estado sólido. I. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências. II. Título.

CDU – 577.15

Eleni Gomes

PRODUÇÃO DE ENZIMAS DESPOLIMERIZANTES DE MATERIAL VEGETAL COM APLICAÇÃO INDUSTRIAL:

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

t. 1.315/04

Tese apresentada para o concurso de Livre-Docência, na área de Microbiologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, UNESP

IBILCE/UNESP
São José do Rio Preto
JUNHO/2004

Agradeço

Ao Tauã, por existir.

Ao João, por ser companheiro.

Ao Roberto, por compartilhar comigo uma carreira.

Aos meus pais, irmãs e irmão, por serem meu aconchego.

Aos meus amigos, por serem presentes.

Aos meus alunos, por fazerem parte da minha história profissional.

À FAPESP, por ter viabilizado financeiramente as pesquisas que realizei.

À UNESP, pela oportunidade profissional.

Dedico

A minha irmã Euza (in memorian), que me deu as primeiras lições sobre determinação e perseverança

SUMÁRIO

Conteúdo **Página**

Capítulo I: Produção de enzimas despolimerizantes de material vegetal com aplicação industrial: Isolamentos de cepas produtoras e caracterização das enzimas.

Introdução..... 01

1-Pectina e pectinases..... 01

2-Xilana e xilanases..... 02

3-Celulose e celulases..... 03

4-Lignina e ligninases..... 05

5-Importância das enzimas que degradam material vegetal na biotecnologia..... 08

5.1-Processamento de sucos e produção de pastas vegetais..... 08

5.2-Produção de polpa e papel..... 11

5.3-Na indústria têxtil..... 14

5.4-Tratamento de outros resíduos..... 16

5.5-Outras Aplicações.....

5.6-Conclusões, problemas a serem resolvidos e perspectivas em relação à linha de pesquisa desenvolvida..... 17

Referências..... 19

Artigo 1: Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão..... 27

Artigo 2: Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: Characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp..... 39

Artigo 3: Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction..... 44

Artigo 4: Screening for pectinolytic activity of woo-rotting Basidiomycetes and characterization of the enzymes..... 48

Artigo 5: Production, characterization and properties of polysaccharide depolymerizing enzymes from a strain of *Curvularia inaequalis*..... 55

Conteúdo Página

Artigo 6: Production, characterization and properties of β-glucosidase and β-xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp..... 61

Artigo 7: Characterization of a cellulose-free xylanase producing *Bacillus* sp for Biobleaching of kraft pulp..... 65

Artigo 8: Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology..... 69

Artigo 9: Application od crude xylanase from *Bacillus licheniformis* 77-2 to the biobleaching of eucalyptus kraft pulp..... 74

Artigo 10: Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima..... 80

Artigo 11: Produção e aplicação de CGTase em produtos de panificação..... 88

Artigo 12: Seleção de substratos para a produção de CGTase pelo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16..... 92

Artigo 13: Produção de ligninases por fungos de degradação branca em resíduos agroindustriais..... 99

Capítulo II: Produção de enzimas despolimerizantes de material vegetal com aplicação industrial: Uso de resíduos agrícolas e agroindustriais para a produção de enzimas por processo fermentativo em estado sólido

Introdução..... 106

1-Biomassa e resíduos..... 106

2- Fermentação em estado sólido (FES)..... 110

3- Conclusões, perspectivas de problemas a serem resolvidos e relação com a linha de pesquisa desenvolvida..... 114

Referências..... 116

Conteúdo Página

Artigo 14: Pectinase production by *Penicillium viridicatum* Rfc3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products..... 125

Artigo 15: Production of Pectinase by solid state fermentation with *Penicillium viridicatum* Rfc3..... 132

Artigo 16: Pectinase production by fungi strains in solid state fermentation using agro-industrial by-products..... 142

Artigo 17: Utilização de resíduos agro-industriais para a produção de pectinase por *Penicillium viridicatum* Rfc3..... 148

Artigo 18: Estudo do tempo de cultivo na produção de pectinases por *Penicillium* sp EGC5 e *Moniella* sp 9SB em fermentação semi-sólida (FSS) de resíduos agrícolas..... 154

Artigo 19: Seleção de substratos para a produção de β-glicosidase em fermentação em estado sólido pelo microrganismo *Thermoascus aurantiacus*..... 161

Artigo 20: Estudo da variação da temperatura em reator de coluna com diferentes densidades aparentes em fermentação semi-sólida para produção de pectinases..... 168

Capítulo III: Produção de enzimas despolimerizantes de material vegetal com aplicação industrial: Microrganismos termofílicos e produção de enzimas termoestáveis

Introdução..... 176

1- Microrganismos termofílicos..... 176

2-Adaptação dos microrganismos à termofilia..... 178

3-Produção de enzimas termoestáveis de importância industrial por microrganismos termofílicos..... 189

3.1-Amilases termoestáveis..... 189

3.2-Pectinases termoestáveis..... 192

3.3-Xilanases termoestáveis..... 194

Conteúdo Página

4-Conclusões, perspectivas de problemas a serem resolvidos e relação com a linha de pesquisa desenvolvida..... 196
Referências..... 197
Artigo 21: Purification and characterization of two β-glucosidases from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*..... 209
Artigo 22: Solid state production of thermostable pectinase from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*..... 216
Artigo 23: Effect of *Bacillus circulans* D1 thermostable xylanase on biobleaching of eucalyptus kraft pulp..... 222
Artigo 22: Glucoamilase: Estrutura e termoestabilização..... 231
Artigo 23: Estudo da produção de ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase) pela linhagem termofílica H69-3..... 240
Artigo: Perfil enzimático produzido pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação em estado sólido e fracionamento de uma poligalacturonase termoestável..... 247
Artigo 24: Screening of thermophilic microbial strains for themophilic amylase production..... 254
Artigo 25: Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* A1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A 13.37..... 270

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

CAPÍTULO I

PRODUÇÃO DE ENZIMAS DESPOLIMERIZANTES DE MATERIAL VEGETAL COM APLICAÇÃO INDUSTRIAL:

Isolamentos de cepas produtoras e caracterização das enzimas

Capítulo I

INTRODUÇÃO

1- Pectinas e pectinases

A pectina é um heteropolissacarídeo ácido que se apresenta como substância coloidal, altamente viscosa, de alto peso molecular e que mantém a integridade da lamela média, parede primária e espaço intercelular de plantas superiores.

A cadeia principal da pectina é formada por monômeros de ácido D-galacturônico que se unem por ligações glicosídicas (α-1, 4). O ácido D-galacturônico é um hemi-acetal cíclico, com o átomo de oxigênio entre os carbonos 1 e 5. Ao C_5 aparece ligada uma carboxila, a qual, na maioria das pectinas, apresenta-se esterificada com um grupo metil. Os C_2 e C_3 podem aparecer acetilados (COLLMER et al., 1988). Um pequeno número de ramnose, arabinose e galactose é parte integrante da molécula de pectina como cadeia lateral (PANDA et al., 2004).

As substâncias pécticas incluem as protopectinas que são insolúveis em água e encontradas, principalmente, nos tecidos de frutas verdes. A partir dessas substâncias, são formadas as pectinas solúveis, durante o amadurecimento do fruto (SAKAI, 1998; KILARA, 1982).

As pectinas solúveis incluem os ácidos pectínicos e aos ácidos pécticos. Os ácidos pectínicos são galacturonanas que apresentam altos teores de metoxilação em suas cadeias. Estes aparecem como pectinatos que são sais ácidos, ou como ácidos que têm propriedades de formar géis com açúcar ou em combinações com cálcio. Os ácidos pécticos são caracterizados por terem baixo grau de metoxilação, sendo chamados também de ácido poligalacturônicos.

As substâncias pécticas são degradadas por enzimas pectinolíticas que são produzidas por plantas e também por microrganismos. Estas enzimas, em função do seu modo de ataque à cadeia de pectina, são classificadas em (NAIDU ; PANDA, 2003; PILNIK; ROMBOUTS, 1981):

1.1- Despolimerizantes

1.1.1) Poligalacturonases que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 em cadeias D-galacturonana de substâncias pécticas. Aparecem nas formas endo e exo. As endo-poligalacturonases [poly (1,4-α-D-

galacturonide) glycohydrolase, EC 3.2.1.15] hidrolisam as ligações entre ácidos D- Galacturônicos no interior do polímero de ácido péctico. As exopoligalacturonases [poly (1,4-α-D-galacturonide) glucuronohydrolase, EC 3.2.1.67, galacturan 1,4-α-galacturonosidase] removem as moléculas de ácido D-galacturônico a partir da extremidade não redutora da molécula. As polimetilgalacturonases atuam preferencialmente nas moléculas de ácido pectínico, enquanto as poligalacturonases têm preferência pelo ácido péctico.

1.1.2) Pectina liases [poly (methoxygalacturonide) lyase, EC 4.2.2.10] eliminam resíduos de 6-metil-Δ-4,5 -D-galacturonato da molécula de pectina (ácido péctico metil-éster) e, portanto, promove despolimerização. Esta enzima é normalmente descrita como pectina-transeliminase, a qual libera ácido galacturônico Δ-4,5-insaturado por um processo de transeliminação. As Pectato liases [poly(galacturonide) lyase ,EC 4.2.2.2)] liberam Δ-4,5 -galacturonato de pectato e de outros poligalacturonídeos, mas não da pectina. As liases são também divididas em endoenzimas que atacam regiões internas de cadeia de α-1-,4-poligalacturonídeos e exo, que atuam terminalmente.

1.2) Desmetoxilante

1.2.1) Pectinesterases (Pectin Pectylhydrolase, EC 3.1.1.11) desesterificam a molécula de ácidos pectínicos através da hidrólise da ligação éster entre a carboxila e o grupo metila, liberando metanol e ácido péctico (pectina + nH_2O = metanol + pectato).

2-Xilana e Xilanases

As xilanas são os principais polissacarídeos da fração hemicelulósica das plantas, sendo formadas por uma cadeia principal de resíduos de xilose, unidos por ligações β-1,4. São, em sua maioria, heteropolissacarídeos que apresentam cadeias laterais curtas constituídas por resíduos arabinosil, glucoronosil e acetil (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997; BIELY, 1985). Homoxilanas, constituídas exclusivamente por xilose, foram isoladas, mas não são comuns na natureza (GALLARDO et al., 2003; EDA et al., 1976).

Microrganismos capazes de degradar a xilana sintetizam uma série de enzimas que atuam sinergisticamente na hidrólise deste substrato (FERREIRA-FILHO, 1994). Este sistema multienzimático é comumente denominado complexo xilanolítico, cujas principais enzimas são (WANG et al., 2003; WOODWARD, 1984):

2.1- Endo-β-1,4-xilanases (1,4-β-D-xilana hidrolase, EC 3.2.1.8), que hidrolisam as ligações internas da cadeia principal da xilana, produzindo xilooligossacarídeos e promovendo a diminuição do grau de polimerização deste polissacarídeo

2.2-β-xilosidases (β-D-xilosídeo xilohidrolase, EC 3.2.1.37), que hidrolisam pequenos xilooligossacarídeos a xilose, a partir da extremidade não redutora.

2.3-Enzimas desramificantes (α-L-arabinofuranosidases [EC 3.2.1.55], α-glucoronidases [EC 3.2.1] e acetilxilana esterases [EC 3.1.1.6] que hidrolisam as cadeias laterais da molécula.

3-Celulose e Celulases

A celulose é um polímero com milhares de moléculas de glicose unidas por ligação β-1,4. A unidade básica repetida é a celobiose. A cadeia da celulose é estabilizada por pontes de hidrogênio internas à cadeia e entre as cadeias adjacentes que se encontram em posição paralela e com a mesma polaridade. Essas interações (internas e entre cadeias) formam um agregado cristalino chamado de microfibrila (GLAZER; NIKAIDO, 1994).

As microfibrilas são combinadas para formar fibras largas, que por sua vez, se organizam em camadas finas (lamelas) para formar a estrutura da parede celular vegetal. Essa região organizada é chamada região cristalina, em contraste com a região amorfa, que é menos ordenada. A proporção dessas frações na celulose isolada varia com a origem e com a forma de extração (GLAZER; NIKAIDO, 1994).

A degradação enzimática da celulose na natureza é feita por um sistema de enzimas extracelulares que, em fungos, são liberadas diretamente no meio,

unesp

enquanto que em bactérias aparecem ligadas à parede celular (BEGUIN; AUBERT, 1994).

O sistema celulolítico de fungos consiste de (BHAT; BHAT, 1997):

3.1- *Endoglucanases ou endocelulases* [1,4-β-D-glucan glucanohydrolase; EC 3.2.1.4] que atacam a CM-celulose e região amorfa da celulose, ao acaso, liberando celooligossacarídeos.

3.2- *Exo-1,4-β-D-glucanases ou exocelulases* [1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase (CBH); EC 3.2.1.91] que atacam o avicel e celulose amorfa sequencialmente, liberando unidades de celobiose a partir da extremidade não redutora da cadeia de celulose. Essa enzima, atuando sinergisticamente com a endoglucanase, promove extensa degradação da celulose cristalina.

3.3-*β-glucosidases* [cellobiase ou β-D-glucoside glucohydrolase; EC 3.2.1.21] que removem resíduos de glicose a partir da extremidade não redutora de celodextrinas e não interage cooperativamente com as endoglucanases na hidrólise da celulose cristalina.

A maioria das bactérias aeróbias produz apenas endocelulases, porém, actinomicetos produzem também a exocelulase e β-glucosidase (BARTLEY et al., 1984). Bactérias anaeróbias como *Clostridium thermocellum* e *C. cellulovarans* produzem um complexo enzimático de alto peso molecular chamado celulossomo. Esse complexo consiste de várias endoglucanases, pelo menos três exoglucanases e β-glucosidase, e apresenta maior afinidade pela porção cristalina do que pela amorfa da celulose. Durante a fase de crescimento logarítmico, esse complexo enzimático fica preso à superfície da célula, podendo ser liberado ao meio durante a fase estacionária.

O *C. thermocellum* apresenta uma camada proteica superficial (camada S) que reveste a parede de polipeptidoglucano, à qual está ligada a proteína Cip A que serve de base para ligações dos peptídeos celulossômicos. A Cip A tem nove domínios que reconhecem os polipeptídeos catalíticos (endoglucanase, celobioidrolase, β-glucosidase e xilanases). As interações entre esses polipeptideos e a CipA obedecem a uma ordem favorável à atuação dos mesmos sobre a celulose. A Cip A tem ainda, domínio para a ligação com a celulose, de modo a aproximar o celulossomo da celulose cristalina (PAGES et al., 2003; LAMED.; BEYER, 1988).

4-Ligninas e ligninases

A lignina corresponde a 15-30% do material lignocelulolítico produzido por fotossíntese (10^{11}-10^{12} ton/ano) e consiste de um heteropolímero amorfo, tridimensional e de elevado peso molecular, formado na matriz celular via polimerização oxidativa de monômeros de fenil propano com os derivados dos álcoois coniferílicos, sinapílicos e p-cumarílicos. Em função de sua estrutura, esse biopolímero é de difícil degradação, comparado aos polissacarídeos, permanecendo nos solos como componentes recalcitrantes do húmus (GLAZER; NIKAIDO, 1994).

A biodegradação da lignina é feita por fenoloxidases, sendo as mais importantes a lacase, lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP). Enquanto a LiP quebra ligações não aromáticas, a MnP e as lacases podem oxidar os componentes fenólicos da lignina (MAYER ; HAREL, 1979)

4.1-Lacases:

As lacases (EC 1.10.3.2) pertencem ao grupo das enzimas cobre-oxidases (ou oxidases com cobre). De acordo com a ligação dos íons de cobre nos seus sítios ativos as cobre-oxidases são divididas em enzimas que possuem sítio mononuclear de cobre (um centro de cobre), como as amino oxidases, e as oxidases com sítio multinuclear de cobre (mais de um centro de cobre), como a tirosinase, ascorbato oxidase, ceruloplasmina e lacases. Entre as oxidases de sitio multinuclear de cobre encontram-se aquelas correspondentes à família das multicobre oxidases azuis, que incluem as lacases (MCGUIRL; DOOLEY, 1999).

Em função do baixo potencial redox (0,7-0,8), comparado com a Lip e MnP, as lacases degradam a lignina oxidando, diretamente, apenas os fragmentos fenólicos da mesma, como os polifenóis, p-difenóis e monofenóis como o-cresol e aminofenóis. A oxidação de não fenólicos como poliaminas, arilaminas, íons inorgânicos e outros, por lacases fúngicas, só ocorre em presença de um "mediador". As "moléculas mediadoras" são substâncias de baixo peso molecular que atuam como um tipo de "lançadeira de elétrons", ou seja, o mediador, é oxidado pela enzima, cujo potencial redox é suficiente para

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

convertê-lo ao estado oxidado pela retirada de um elétron, embora não consiga fazê-lo diretamente com substratos não fenólicos. A molécula do mediador oxidada difunde-se do sítio ativo da enzima e passa a oxidar outros compostos, que, em função do alto peso molecular, não poderiam entrar diretamente no sítio da enzima (KERSTEN et al. 1990).

Vários metabólitos de microrganismos e de plantas, como álcool veratrílico, ácido fenilacético, benzaldeído, anisaldeído, hidroxibenzaldeído 4-hidrobenzil álcool, amino ácidos e derivados (metionina, cisteína, tirosina e glutationa), atuam como mediadores da oxidação de compostos não fenólicos pela lacase. Além dos compostos metabólicos, o 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) e o 1-hidroxibenzotriazol (HBT) são oxidados pelas lacases, formando (HBT°), o cátion ($HBTS^{+}$) e o cátion ($HBTS^{+2}$). A função desses compostos oxidados é a oxidação de álcoois aromáticos, podendo, ainda, oxidar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de alto peso molecular, como naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo-fluoranteno e benzopireno, sem a necessidade do contato direto da enzima com os mesmos (JOHANNES; MAJCHERCZYK, 2000).

4.2- Peroxidases

Peroxidases são enzimas que apresentam sítios ativos contendo grupos prostéticos. Em peroxidases fúngicas, lignina peroxidase (LiP EC 1.11.1.14) e manganês peroxidase (MnP EC 1.11.1.13), o grupo prostético é a ferriprotoporfirina IX. Nas peroxidases no estado nativo, o Ferro III é, em sua maioria, penta-coordenado e o grupo heme está unido covalentemente à apoproteína por uma ligação na qual a cadeia lateral de um aminoácido está ligada na quinta posição de coordenação do ferro III (KAPICH et al., 2004; SOLOMON et al., 1996).

O mecanismo de ação dessas enzimas é descrito a seguir (HINER, 2002).

LiP [Fe^{+3}. porfirina] + $H_2O_2 \rightarrow$ Composto I [Fe^{+4} = O porfirina $^{\bullet +}$] + H_2O (1)

LiP-I [Fe^{+4} = $O^{\bullet}$ porfirina$^{\bullet +}$] + S$\rightarrow$ LiP-II [Fe^{+4} = $O^{\bullet}$porfirina] + $S^{\bullet}$ (2)

LiPII [Fe^{+4} = $O^{\bullet}$ porfirina] +S $\rightarrow$ LiP repouso [Fe^{+3} $^{\bullet}$ porfirina] + $S^{\bullet}$ + H_2O(3)

$LiPII\ [Fe^{+4} = O.\ porfirina] + H_2O_2 \rightarrow LiP\ III\ [Fe^{+3}.porfirina\text{-}O_2^-]$ (inativo) (4)

$LiP\ III\ [Fe^{+3}.porfirina\text{-}O_2^-] + S^+. \rightarrow LiP\ [Fe^{+3}.\ porfirina^+] + O_2 + S$ (5)

A Lip é relativamente inespecífica para o substrato redutor, uma característica compartilhada com outras peroxidases não ligninolíticas que oxidam substratos fenólicos e corantes. Porém, diferem destas devido ao fato de que enquanto radicais fenoxilas são os primeiros produtos de oxidação de substratos fenólicos pelas peroxidases em geral, os cátions aromáticos são formados após a oxidação de anéis aromáticos não fenólicos pela LiP. As reações subseqüentes do radical formado são responsáveis pelos produtos detectados durante a oxidação de compostos derivados da lignina pela LiP (HIGUSHI, 1985).

O metabólito secundário de fungos, o álcool 3,4-dimetoxibenzílico ou álcool veratrílico (AV) é um excelente substrato redutor da LiP, funcionando como um mediador redox entre a enzima e a lignina. Essa mediação redox envolve a oxidação do AV a um radical catiônico ($AV^{\cdot+}$) o qual está ligado à enzima. A subseqüente remoção de um elétron por esse cátion resulta na oxidação da lignina e redução do mediador a AV. Na ausência de substrato redutor alternativo, o AV é oxidado a aldeído veratrílico (ADV) (HAVE; FRANSSEN, 2001).

A manganês peroxidase (MnP) é também uma oxidoredutase não específica. Seu mecanismo catalítico é muito semelhante àquele descrito para a LiP e inclui uma enzima com íon férrico, bem como, compostos intermediários I e II. Porém, em contraste com a LiP, a MnP usa apenas o Mn^{+2} como substrato doador de elétrons, oxidando-o a Mn^{+3} que é o responsável pelo desencadeamento de reações de oxidação de outras moléculas orgânicas (HOFRICHTER, 2002).

O ciclo catalítico inicia-se com a ligação de H_2O_2 ou um outro peróxido orgânico ao íon férrico da enzima, formando um complexo ferro-peróxido. A subseqüente clivagem da ligação O-O do peróxido requer a transferência de dois elétrons do grupo heme, resultando na formação do Composto I da MnP, o qual é um complexo Fe^{+4}-oxo-porfirina. Em seguida, a ligação dioxigênio é quebrada heteroliticamente e uma molécula de água é liberada. A redução subseqüente, prossegue através do Composto II de MnP (complexo Fe^{+4}-oxo-

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

porfirina). Um íon Mn^{+2} atua como doador de 1 elétron para essa porfirina, sendo oxidado a Mn^{+3}. A redução do Composto II gera um outro Mn^{+3} a partir de um segundo Mn^{+2} levando à regeneração da enzima nativa e liberando uma segunda molécula de água (JOHJIMA, 2002).

Quelatos de Mn^{+3} com ácidos carboxílicos podem ainda reagir um com o outro e se converterem em radicais alquila, com subseqüente reação espontânea com dioxigênio resultando na formação de radicais superóxidos, que podem ser utilizados pela MnP em ausência de H_2O_2 externo. Compostos aromáticos não fenólicos, com baixo potencial redox, como tetrametoxibenzeno ou antraceno são sujeitos à oxidação pelo Mn^{+3} via retirada de um elétron do anel aromático, originando radicais cátions arila (NAKAYAMA ; AMACHI, 1999).

Alguns co-oxidantes como compostos orgânicos contendo enxofre (glutationa, L-cisteína), bem como ácidos graxos insaturados (ácido linoleico, Tween 80) são oxidados pelo sistema MnP formando radicais thiil e peroxil, que em presença de dioxigênio, podem atacar estruturas recalcitrantes da lignina, as quais normalmente não são atacadas pela MnP e ainda, são fontes de H_2O_2 (HAVE ; FRANSEN, 2001).

Algumas MnP, além do Mn^{+2} , oxidam também compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos (vermelho fenol, álcool veatrílico) sendo consideradas formas híbridas de Lip e MnP. Ainda não é clara a forma como atuam, a despeito do fato de Lip e MnP serem enzimas intimamente relacionadas (HOFRICHTER, 2002).

5-Importância das enzimas que degradam material vegetal na biotecnologia

5.1- Processamento de sucos e produção de pastas vegetais

O princípio básico da biotecnologia está na observação dos fenômenos naturais, como a relação entre os diferentes tipos de organismos vivos e destes com o meio ambiente, e desenvolver, a partir daí, processos aplicáveis á indústria ou a outras vertentes da tecnologia.

As enzimas utilizadas pelos microrganismos nos processos de ciclagem do material vegetal, são muito usadas em processamentos de vegetais na indústria de alimento humano e animal, na indústria papeleira, na indústria têxtil, na indústria farmacêutica como medicamento, cosméticos ou em métodos diagnósticos e no tratamento de resíduos gerados por diferentes processos tecnológicos.

Uma das mais antigas aplicações das enzimas que degradam a parede celular vegetal está na indústria de processamento de sucos de frutas e outros vegetais, através da facilitação do processo de extração (ROMBOUTS; PILNIK, 1980).

As células parenquimáticas, que são as células do mesocarpo que armazenam os sucos, têm apenas a parede primária, a qual é composta por celulose, hemicelulose, pectina e proteínas. A parede de uma célula é aderida a outra, por uma camada constituída principalmente por pectina (lamela média), que chega a constituir 5-10% do peso total da fruta. Para a extração do suco, as paredes dessas células precisam ser rompidas. Os processos utilizados para esse fim podem ser mecânicos, compreendendo a desintegração branda ou moagem e prensagem, ou processos mistos, envolvendo ação de enzimas que rompem a parede celular, seguida de prensagem. A ação de pectinase, associada às de xilanase e celulase, promove a fragmentação da parede celular vegetal, facilitando a prensagem e aumentando rendimento do suco extraído (ALKORTA et al, 1998; SCHIRP et al., 2003).

A liberação do suco de frutas macias, como maçã, framboesa, morango, cereja, banana, etc, por processo somente mecânico, apresenta baixo rendimento em função do alto teor de pectina das mesmas. Na prensagem, os sucos dessas frutas se aderem à polpa rica em pectina, dificultando sua recuperação. O uso de pectinase leva à degradação dessa pectina, diminuindo a viscosidade da polpa e aumentando o volume de suco extraído em até 90%. Além de aumentar o rendimento, a despectinização da polpa melhora a clarificação, diminui a viscosidade e realça o "flavor" dos sucos. Em sucos de uvas e preparo de mostos de vinhos, a aplicação de pectinases reduz o tempo

de esmagamento da fruta e aumenta a extração das antocianinas da casca, aumentando a intensidade da cor do suco (KASHAYAP et al., 2001).

O suco de laranja é obtido por meio de extratoras que cortam e prensam a laranja, obtendo-se duas frações: a casca e o suco. Misturado a este, encontram-se as sementes e polpa. Estas últimas são separadas do suco por peneiramento. O suco assim obtido é considerado "de primeira categoria" e é comercializado "in natura" ou concentrado. O suco a ser concentrado pode ser tratado com pectinase de modo a evitar a geleificação da pectina residual e incrustações nos equipamentos no momento da evaporação (LEA, 1998).

A polpa, obtida pelo peneiramento, ainda contém considerável quantidade de suco. Para facilitar a extração do mesmo, a polpa é tratada com pectinases, seguindo-se lavagens da mesma para extrair um suco de "segunda categoria" chamado de "pulp wash" e que tem em torno de 3°Brix. Esse suco geralmente é concentrado até 66°Brix e comercializado como ingrediente para refrigerantes e confeitos.

A clarificação dos sucos é outra importante aplicação das pectinases. Durante o processo de prensagem das frutas, fragmentos da parede, ricos em pectinas e outros compostos celulares, são arrastados e se complexam, causando a turbidez do suco. Esse complexo consiste de um núcleo de proteína com carga positiva, que é "coberto" por moléculas de pectina, com carga negativa, ou interações entre polifenóis e pectina. A degradação da pectina pelas pectinases libera as moléculas carregadas, as quais se agregam com outras de cargas opostas, formando partículas maiores que são mais facilmente removidas por filtração ou ultrafiltração. A degradação da pectina durante o processo de clarificação também leva à redução da viscosidade dos sucos (YOIN et al., 2004).

O emprego de pectinases também é muito adequado para a produção de pastas e purês a partir de frutas e legumes, através do processo de maceração. Esse processo consiste na transformação de um tecido vegetal organizado em uma suspensão de células separadas e intactas, resultando em uma pasta usada como base para sucos ou nectar, alimentos para bebês e como ingredientes para elaboração de produtos como pudins e iogurtes. O processo enzimático é fundamental para a manufatura desses produtos, visto

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

que o processo mecânico rompe as células. Desde que o alvo do tratamento enzimático é a obtenção de células intactas, a degradação enzimática deve ficar restrita à lamela média, devendo ser usadas apenas poligalacturonases ou pectinaliases purificadas ou parcialmente purificadas, ou seja, livres de xilanases e celulases (SUUTARINEN et al., 2003; CHESSON ; CODNER, 1978).

As pectinases podem também ser aplicadas na separação da polpa e da semente do café. As enzimas removem a mucilagem da polpa, reduzindo o tempo de fermentação do grão que, de 10-80h, passa a ser de 20h (SILVA et al., 2000).

A extração de óleos de canola, girassol, palma e de oliva geralmente ocorre por adição de solventes como o hexano. A degradação enzimática da parede celular facilita a extração do óleo por prensagem, aumentando o rendimento e reduzindo o uso de hexano cujos resíduos são poluente tóxicos (SOTO et al., 2004; KASHYAP, 2001).

5.2- Produção de polpa e papel

A madeira é composta principalmente por lignina, hemicelulose e celulose. Na transformação da madeira em papel, a fração de celulose deve ser extraída dos outros materiais. Isto acontece em duas etapas designadas polpação e branqueamento. Inicialmente, a madeira é descascada e cortada em toras, que são lascados para a transformação em polpa (pasta). A polpação pode ser feita por processos mecânico, químico ou semiquímico. Por razões econômicas, os processos químicos são atualmente, os mais empregados e consistem dos processos sulfato ou Kraft e a polpação sulfito. O processo kraft é atualmente, o mais empregado e consiste em cozer as fatias de madeira numa solução de pH alcalino (pH10) composta de NaOH e sulfeto de sódio, em temperaturas elevadas (90°C). O processo kraft degrada e dissolve 90 a 95 % das ligninas presentes na lamela média, na parede primária e na parede secundária da madeira baixando o número kappa (κ) do material (indicador do teor de lignina da polpa). Para não danificar a celulose, o processo é interrompido deixando ainda uma certa quantidade de lignina na polpa, que fica de cor marrom.O passo seguinte, o branqueamento, tem por objetivo a

eliminação seletiva da lignina residual preservando ao máximo as fibras de celulose. Os principais agentes para esta finalidade são peróxido de hidrogênio, oxigênio, ozônio e cloro. A maioria das indústrias de papel usa uma sucessão de etapas de branqueamento baseadas no cloro, seguidas de extração através de soluções alcalinas. O cloro provê um branqueamento excelente da polpa, porém, resulta na formação de mais de 200 compostos organoclorados poluentes persistentes (POPs) identificados como fenóis e policíclicos aromáticos, organoclorados alifáticos e polifenil clorados. Entre esses últimos, chamados dioxinas, a mais tóxica é a bifenilpoliclorado (PCB) que exerce efeito mutagênico em concentração de parte por trilhão (CALL; MÜCKE, 1997; MARTIN et al., 1995).

Entre as tecnologias disponíveis a serem usadas como alternativas ao cloro, a aplicação de enzimas como xilanases, ligninases e pectinases, nas etapas de polpação e branqueamento, tem sido a mais promissora (KANSOH et al., 2004).

O mecanismo do branqueamento exercido pelas xilanases não é bem entendido, porém, acredita-se que com o processo de cozimento, a lignina modificada se adere à fibra de celulose. A xilana re-precipitada, após ser solubilizada pelo álcali, cobre a lignina depositada na fibra. As xilanases removeriam a xilana residual da pasta, facilitando a liberação dos resíduos de lignina ou, mais provavelmente, aumentaria a acessibilidade da lignina residual à seqüência do tratamento de branqueamento (TECHAPIM et al., 2003). Há ainda, relatos de que o tratamento alcalino solubiliza os polissacarídeos ácidos da madeira (pectinas e ácidos poligalacturônicos) os quais também se ligam ao complexo lignina-xilana. Dessa forma, o uso de misturas de xilanase e pectinase pode levar à otimização do processo de branqueamento (RICARD, REID, 2004; REID; RICARD, 2000).

Diferentemente das xilanases que atuam no processo de branqueamento de forma indireta, as ligninases atuam diretamente sobre a lignina na remoção destes polímeros no branqueamento de polpas kraft (HARAZONO et al., 1996).

Pelo fato de a lacase sozinha não poder atuar sobre os substratos não fenólicos da lignina, mediadores de baixo custo e ambientalmente seguros

unesp

foram desenvolvidos para serem aplicados em conjunto com a lacase. A companhia Lignozyme GmbH da Alemanha desenvolveu o mediador hidroxibenzotriazol (HBT), que melhorou o desempenho da lacase. O sistema promoveu acima de 40% de deslignificação de polpas kraft de diferentes origens (MAYER.; STAPLES, 2002; MOSAI et al., 1999).

Ainda, há a possibilidade da aplicação das lacases, xilanases e pectinases no branqueamento da polpa através do emprego direto dos fungos que secretam essas enzimas, juntamente com mediadores químicos, no processo chamado de biopolpação, que consiste do tratamento dos cavacos antes do cozimento (HATAKKA, 2001; BREEN, 1999; MESSNER; SREBOTNIK, 1994).

A cor escura dos efluentes das águas residuais das indústrias de polpa e papel é devido à lignina e seu derivados que são liberados principalmente durante as etapas de polpação e branqueamento da polpa. Como resultado de reações químicas oxidativas há formação de duplas ligações conjugadas com os anéis aromáticos, produção de quinonas e seus derivados originando a cor escura dos efluentes da polpação. No processo Kraft, a lignina é modificada para tio e álcali-lignina e, no processo sulfito, ela é modificada para a forma lignosulfonada que é resistente à degradação devido à presença de ligações covalentes difenil carbono-carbono (SANKARAN; VAND LUDWIG, 1971).

A água residual originada do primeiro estágio de extração alcalina é chamada de licor de extração cáustica e designada como efluente do estágio E1. Embora tais licores sejam produzidos em baixos volumes, eles são altamente coloridos, contribuindo com 80% da cor, 30% da demanda biológica de oxigênio (DBO) e 60% da demanda química de oxigênio (DQO) da descarga total da fábrica (efluentes combinados) (GARG; MODI, 1994).

Os biotratamentos podem empregar diretamente os microrganismos, como os fungos de decomposição branca, por causa de sua conhecida habilidade para degradar a lignina que é a principal responsável pela cor em efluentes da fabrica de papel. Por serem meios fluidos, os efluentes poderiam ser tratados pelo uso de células imobilizadas em suportes, as quais poderiam ser reutilizadas várias vezes. Ainda, o uso das enzimas recuperadas dos caldos de fermentações, na forma imobilizada ou aplicadas em colunas

apropriadas, leva à oxidação de vários fenóis para radicais aril que, espontaneamente, se polimerizam em complexos insolúveis facilmente removíveis por precipitação, filtração ou centrifugação (HAKULINEN, 1988).

5.3- Indústria têxtil

Enzimas pectinolíticas estão envolvidas no "amolecimento" e degomagem da juta, linho, cânhamo e fibra de coco (BRUMANO et al., 1993). O "amolecimento" consiste de um processo fermentativo no qual, bactérias como *Bacillus e Clostridium* ou fungos, como *Penicillium* e *Aspergillus*, decompõem a pectina da casca, liberando as fibras brutas (KAPOOR et al., 2001; BRUHLMANN et al., 1994). Comercialmente, esse processo ocorre em aerobiose, no qual as fibras brutas são espalhadas em camadas finas no solo e expostas a ação de bactérias e fungos por 2 a10 semanas, ou em anaerobiose, no qual as fibras são submersas em água em um tanque de concreto, em ausência de oxigênio (SHARMA, 1987). Esses processos podem gerar fibras de má qualidade ou perdas de material. A aplicação de preparados enzimáticos comerciais contendo poligalacturonase, pectina liase, xilanases e traços de celulases, pode levar a uma rápida e eficiente extração das fibras (CALAFELL; GARRIGA, 2004; BARACAT et al, 1989; SHARMA, 1987).

A produção de "denin" envelhecido tem sido requerida para confecção de cerca de um bilhão de jeans por ano. Nesse processo, as celulases removem fragmentos do algodão da superfície da peça e facilitam a abrasão do corante índico da superfície da fibra. Esse tratamento enzimático substituiu o processo "stonewashing" tradicional (HERKINHEIMO et al., 2003; BHAT. 2000).

O biopolimento representa uma outra aplicação das celulases em tecidos não-demin. Todo material celulósico, apresenta, em diferentes extensões, a tendência a formar cotões (fibras curtas de celulose proeminentes na superfície do tecido), o que tradicionalmente, é bloqueado por uso de agentes químicos. As celulases quebram essas pequenas fibras, dando ao tecido uma aparência de novo (BHAT; BHAT, 1997). Entretanto, dados recentes têm apontado que, outras enzimas não celulolíticas (lípases. xilanases,protease e pectinases) são importantes para a limpeza do algodão.

pois cerca de 10% da fibra bruta correspondem a graxas, pectinas, proteínas, xilanas, ligninas e substâncias de cor, das quais, parte podem ser retidas nas fibras, diminuindo a qualidade do tecido, justificando o tratamento enzimático (CSISZÁR et al, 2001).

Além da etapa de extração das fibras e produção do tecido de algodão, a etapa de tingimento e/ou estamparia, na indústria têxtil, pode ser beneficiada pelo uso das enzimas. Essa etapa da produção de tecidos gera de $7x10^5$ ton métricas por ano de resíduos altamente poluentes e de difícil tratamento. Há mais que 100.000 corantes comerciais disponíveis para as indústrias têxteis, os quais são projetados para serem resistentes à luz, água e agentes oxidantes. Tais características tornam esses compostos difíceis de serem biodegradados ao serem liberados nos sistemas aquáticos, permanecendo como compostos recalcitrantes no ambiente, sendo, muitos deles, tóxicos e carcinogênicos (FU; VIRARAGHAVAN, 2001). Os cromóforos dos grupos aniônicos e não iônicos são principalmente compostos azo e antraquinonas. O grupo azo, ao sofrer redução, se transforma em aminas tóxicas nos efluentes. Corantes de antraquinonas, devido à estrutura aromática "fundida", são de muito difícil degradação, permanecendo coloridos por muito tempo na água residual. Deve ser destacado, que a perda de cor de um determinado corante não é indicativo seguro de sua degradação visto que resíduos aromáticos tóxicos podem ser formados por modificação química ou biológica de suas moléculas complexas (MOU et al., 1991; BANAT et al;1996).

A lignina peroxidase (Lip), manganês peroxidase (MnP) e lacase, apesar de serem responsáveis pela biodegração da lignina, são enzimas não específicas para a mesma. Seu mecanismo de ação oxidativo permite que uma vasta gama de poluentes químicos, cujas estruturas são próximas aos derivados da lignina, como os recalcitrantes hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) e os corantes residuais das indústrias têxteis possam ser atacados, havendo degradação total ou parcial dos mesmos (PAPINITTI; FORCHIASSIN, 2004; FU; VIRARAGHAVAN, 2001; DAVIS ; BURNS, 1990).

5.4- Tratamento de outros resíduos

Enzimas despolimerizantes têm sido muito pesquisadas com vistas no biotratamento de efluentes industriais e resíduos domésticos.

Compostos aromáticos fenólicos são comuns em águas residuais de uso doméstico ou industrial. Esses compostos aparecem, ainda, em grandes quantidades nos solos devido ao intenso uso de defensivos agrícolas. Alquilfenol etoxilatos, por exemplo, pertencem a uma classe de surfactantes usados em detergentes domésticos, formulações de pesticidas e em produtos de uso industrial. Dessa forma, são descartados junto com esgotos domésticos e efluentes industriais, além de atingirem diretamente o solo, quando usados como defensivos agrícolas. Supõe-se que 5000.000 toneladas desses produtos sejam produzidas anualmente no mundo e que 60% desse material acabe descartado de alguma forma, no ambiente aquático. Sabe-se que os metabólitos desse produto são mais tóxicos que os seus precursores e mimetizam o efeito do hormônio estrogênio no ser humano. Os policíclicos aromáticos e organoclorados são também poluentes de preocupação em efluentes industriais, assim como, os resíduos de solventes e corantes (YING GUANG-GUO et al, 2002; DURÁN; ESPOSITO, 2000).

As peroxidases e lacases podem catalisar a oxidação desses fenóis e outros compostos aromáticos em tratamentos de água. Artigos têm relatado a oxidação de 2,4,6-triclorofenol gerando 2,6-dicloro-1,4-benzoquinona e a remoção de fenóis e clorofenil de efluentes por ligninases fúngicas. A literatura é vasta com relação às informações acerca da biodecomposição desses compostos recalcitrantes através do uso de enzimas livres ou do uso da própria célula como agente de catálise (WANG et al., 1999; FAHR et al., 1999; ROPER et al., 1995).

5.5-Outras aplicações

A reciclagem industrial de papéis de escritório e jornais, na última década, passou a uma importante atividade econômica e de geração de empregos. Entre milhares de toneladas de papel recicladas, 50-60% têm impressão xerográfica ou tinta laser. Esses últimos são de difícil reaproveitamento visto que nessas impressões são usadas resinas

termoplásticas, como copolímeros de acrilatos e estireno, ligados ao pigmento (carbon black). Os "pelets" dos "toners" são fixados por fusão e colocados eletrostaticamente sobre o papel, onde se misturam com a fibra. No curso da repolpação convencional, essa tinta é liberada das fibras na forma de placas planas, com difícil remoção ou dispersão, pois as mesmas não flotam bem, como acontece com outras tintas, portanto, a separação dos pigmentos e fibras é precária e o papel reciclado é de má qualidade pois retém pontos de pigmentos. O uso de enzimas como celulases, xilanases e pectinases leva ao rompimento da ligação fibra-toner, liberando mais facilmente o pigmento, além de reduzir o tamanho das partículas de tinta, facilitando sua remoção (PELACH et al., 2003; VIEDTURS et al., 1999).

As lacases presentes em mostos de vinhos oxidam os compostos fenólicos que inibem a fermentação alcoólica pela levedura. Essas enzimas, imobilizadas em quelantes de cobre, também foram usadas com sucesso para remover fenóis como epicatequinas, ácido ferrúlico e ácido *o*-cumárico presentes em vinho branco (SERVILI et al, 2000).

Um novo método de análise de morfina utilizando lacase foi desenvolvido visando a distinção entre a morfina e a codeína. Foi construído um sensor baseado em lacase e glucose desidrogenase imobilizadas em um eletrodo de oxigênio "Clark". A morfina é oxidada pela lacase com consumo de oxigênio e regenerada pela glucose desidrogenase. Como a lacase não oxida a codeína, o sensor torna-se específico para a morfina, podendo detectá-la em concentrações entre 32 nM e 100 μM, num prazo de 1 minuto (BAUER et al., 1999).

6- Conclusões, problemas a serem resolvidos e perspectivas em relação à linha de pesquisa desenvolvida.

O uso de enzimas microbianas, que degradam material vegetal, em processos biotecnológicos, se insere no escopo do desenvolvimento de tecnologias limpas, ou ambientalmente seguras. A despeito do fato de que o uso dessas enzimas já seja uma tecnologia bem estabelecida em escala

industrial ou de laboratório, e que seja um assunto de um grande interesse, dado o extenso número de relatos científicos, a aplicação extensiva dessa tecnologia em grande escala nas indústrias e no tratamento de resíduos, ainda é limitada, principalmente devido ao custo, formas de aplicação e algumas propriedades das enzimas. Consideráveis avanços ainda precisam ser feitos, principalmente com respeito ao rendimento e produção de enzimas, de forma a reduzir o custo, além da diversificação de suas propriedades físico-químicas, para que atuem bem nas condições adversas existentes nos sistemas industriais e no meio ambiente. O uso de meios de culturas de baixo custo e a obtenção de novas linhagens produtoras de enzimas com características diversificadas, podem ser soluções para estes propósitos. Tendo em vistas essas considerações, os trabalhos de pesquisa relacionados a seguir tiveram como objetivos isolar novas cepas microbianas produtoras de enzimas que degradam material vegetal, a partir de amostras do meio ambiente, identificá-las quando possível, estudar seu potencial de produção de pectinases, xilanases e ligninases e caracterizar essas enzimas.

unesp

Referências

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

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R.. Microbial decoloration of textile-dye-containing effluent: a review. **Bioresource technol**. v.58, 217-227, 1996.

BARACAT, M.C.; VALENTIM,C.; MUCHOVEJ, J.J.; SILVA, D.O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. **Biotechnol. Let**., v.11, p.899-902, 1989.

BARTLEY, T.; WALDRON, C.; EVELEIGH, D. Acelobiohydrolase from a thermophilic actinimycete *Microbispora bispora*. **Appl. Biochem. Biotechnol**., v.9, p.334-337, 1984.

BAUER, CG, KUEHN, A, GAJOVIC, N, SKOROBOGATKO, O, HOLT, PJ, BRUCE, NC, MAKOWER, A, LOWE, CR ; CHELLER, FW. New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. **J. Anal. Chem.,** v.364, p.179-183, 1999.

BEGUIM, P.; AUBERT, J.P. The biological degradation of cellulose. **FEMS Microbiol. Rev**., v.13, p.25058, 1994.

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

BHAT, M.K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnol. Adv**., v.15, p.583-620, 1997.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends Biotechnol**., v.46, p.286-290, 1985.

BREEN, A. AND SINGLETON, F. L. Fungi in lignocellulosic breakdown and biopulping. **Cur. Op. Biotechnol**. 10: 252-258, 1999.

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

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

BRUMANO, M. H. N; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F.; SILVA, D. O. Pectin lyase activity of *Penicillium griseoroseum* related to degumming of ramie. **Rev. Microbiol.**, v. 24, p. 175-178, 1993.

CALAFELL, M.; GARRIGA, P. Effect of some process parameters in the enzymatic scouring of cotton using an acid pectinase. **Enzyme Microb. Technol.**, v.34, p.326-331, 2004.

CALL, H.P ; MÜCKE, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (lignozym-process). Minireview. **J. Biotechnol.**, v.53, p.163-202, 1997.

CHESSON, A.; CODNER, R.C. The maceration of vegetable tissue by a strain of *Bacillus subtilis*. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 44, p.347-367, 1978.

COLLMER, A.; RIED, J. L.; MOUNT, M.S. Assay Methods for pectic enzymes. **Methods Enzymol**, v.161, par13, p.329-335, 1988.

CSISZÁR, E.; URBÁNSZKI, K.; SZAKÁCS, G. Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulose and xylanase enzymes. **J. Mol. Cat. B: Enz.**, v.11, p.1065-1072, 2001.

DAVIS S.; BURNS F.G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.32, p.721-726, 1990.

DURÁN, N.; ESPOSITO, E. Potential application of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compound in wastewater and soil treatment: a review. **Appl. Cat. B: Environm.**, v.28, p.83-99, 2000.

EDA, S.; OHNISHI, A.; KATO, K. Xylan isolated from stalk of *Nicotiana tabacum*. **Agric. Biol. Chem.**, v.40, p.359-364, 1976.

FAHR, K.; WETZSTEIN, H-G.; GREY, R.; SCHLOSSER, D. Degradation of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi. **FEMS Microbiol. Let.**, v.175, p.127-132, 1999.

FERREIRA-FILHO, E.X. The xylan-degrading enzyme system. **Bras. J. Med. Res.**, v.27, p.1093-1109, 1994.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

FU, Y.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. **Bioresource Technol**. V.79, p.251-262, 2001

GALLARDO, O.; DIAZ, P.; PASTOR, F.I.J. Characterization of a *Paenibacillus* cell-associated xylanase with high activity on ary-xylosides: a new sub-class of family 10 xylanases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.61, p.226-233, 2003.

GARG, S. K.; MODI. D. R. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. **Crit. Rev. Biotechnol**. v.19, 85-112, 1999.

GLAZER, A. N., NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology**. New York: W. H. Freeman and Company, 1994. p. 328-329.

HAKULINEN, R. The use of enzymes for wastewater treatment in the pulp and paper industry - a new possibility. **Wat. Sci. TechnoL.**, v.20, 251-262, 1988.

HARAZONO, K, KONDO R, ; SAKAI K. Bleaching of Hardwood Kraft Pulp with Manganese Peroxidase from *Phanerochaete sordida* YK-624 without Addition of MnSO(inf4) **Appl. Envir. Microbiol.**, v.62, 913-917, 1996.

HATAKKA, A. Biodegradation of lignin. In: HOFRICHTER, M.; STEINBÜCHEL, A. (eds) **Biopolymers: Biology, Chemistry, Biotechnology, Application**, vol. 1. Wiley VCH, Weinheim, Germany. pp 129-180, 2001.

HAVE, R. T; FRANSSEN, M.C.C.R. On a revised mechanism of side products formation in the lignin peroxidase catalysed oxidation of veratryl alcohol. **FEBS Letters**, v.487, p.313-317, 2001.

HEIKINHEIMO, L.; BURCHET, J.; MUTTINEN-OINEN, A. Treating denin fabrics with *Trichoderma reesei* cellulases. **Text Res. J.**, v.70, p.969-973, 2003.

HIGUSHI, T. Biosynthesis of lignin. In: HIGUSHI T (ed). **Biosynthesis and Biodegradation of Wood of Wood Components**. Orlando, Academic Press, p. 141-161, 1985

HINER, A.N.P. Mechanisms of compounds I formation in heme peroxidases. Review. **J. Inorg. Biochem.**, v.91, p.27-34, 2002.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme Microb. Technol.**, v.30, p.454-466, 2002.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator system. **Appl. Environm. Microbiol.**, v.66, n.2, p.524-528, 2000.

JOHJIMA, T. Veratry alcohol binding sites of lignin peroxidase from *Phanaerochaete chrysosporium*. **J. Mol. Cat. B: Enz.**, v.17, p.49-57, 2002.

KANSOH, A.L.; NAGIEB, Z.A. Xylanase and mannanase enzymes from Streptimyces galbus NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. **Anton. Leeuw. Int. J.G.**, v.85, p.103-114, 2004.

KAPICH, A.N.; PRIOR, B.A.; BOTHA, A. Effect of lingo-cellulose containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanaerochaetse chrysosporum* MF-446. **Enzyme Microb. Technol.**, v.34, p.187-195, 2004.

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 Biochem.**, 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. **Biores. Technol.**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KERSTEN P.J. Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzene. **Biochem. J.**, v.268, p.474-480, 1990.

KILARA, A. Enzymes and their uses in the processed apple industry: A review. **Proc. Biochem.**, v.23, p.35-41, 1982.

LEA, A.G.H. Enzymes in the production of beverages and fruits juices. In: TUCKER, G.A.; WOODS, L.F.J. (Ed.). **Enzymes in Food Processing**, 2th ed, Glasgow, Backie Academic &Professional, 1998. p.223-247.

unesp

LAMED, R.; BEYER, E.A. The cellulosomo of *Clostridium thermocellum*. **Adv. Appl. Microbiol.**, v.33, p.1-46, 1988.

MARTIN, V.J.J.; BURNISON, B.K.; LEE, H.; HEWITT, M. Chlorophenolics from high molecular weight chlorinated organics isolated from bleached kraft mill effluents. **Holzforschung**, v.49, p.453-462, 1995.

MAYER, A.M. ; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry,** v.18, p.193-215, 1979

MAYER, A.M.; STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme-Review. **Phytochemistry**, v.60, p.551-565, 2002.

MCGUIRL, M.A. ; DOOLEY, D.M. Cooper-containing oxidases. **Cur. Op. Chem. Biol.**, v.3, p.138-144, 1999.

MESSNER,K. ; SREBOTNIK, E. Biopulping: An overview of developments in a environmentally safe paper-making technology. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.13, p.351-364, 1994.

MOSAI, S., WOLFAARDT, JF, PRIOR, BA, CHRISTOV, LP. Evaluation of selected white-rot fungi for biosulfite pulping. **Biores. Technol**. 68: 89-93, 1999.

MOU, D.G., LIM, K. K. ; SHEN, H.P.. Microbial agents for decolorization of dye wastewater. **Biotechnol. Adv**. v.9, 613-622, 1991

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

NAKAYAMA, T.; AMACHI, T. Fungal peroxidase: its structure, function, and application. **J. Mol. Cat. B: Enz**, v.6, p.185-198, 1999.

PAGES, S.; VALETLE, O.; ABDOU, L. A rhanmngalacturonan lyase in the *Clostridium cellulolyticum* cellulosome. **J. Bacteriol**., v.185, p.4727-4733, 2003.

PANDA, T.; SUSHMA, R.N.; KUMAR, M.P. Regulation of synthesis of pectinolytic enzymes of *Aspergillus niger*. **Enzyme Microb. Technol**., v.34, p.466-473, 2004.

PELACH, M.A.; PASTOR, F.J.; PUIG, J. Enzymic deinking of old newspaper with cellulose. **Process Biochem**, v.38, p.1063-1067, 2003.

PAPINITTI, V.L.; FORCHIASSIN, F. Modification of malachite green by *Fomes sclerodermeus* and reduction of toxicity to *Phanaerochaetes chrysosporum*. **FEMS Microbiol. Lett**., v,231, p.205-209, 2004.

PILNIK, W.; ROMBOUTS F.M. Pectic enzymes. In: BIRCH, G.C.; BLAKEBROUGH, N.; PARKER, N.K. (Ed). **Enzymes in Food Processing**, London, Applied Science Publishers, 1981. p105-128.

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

RICARD, M.; REID, D. Purified pectinases lowers cationic demand in peroxide biobled mechanical pulp. **Enz. Microb. Tech**, v.34. p.499-504, 2004.

ROMBOUTS, F.M.; PILNIK, W. Pectic enzymes. In:ROSE, A.H (Ed.). **Microbial Enzymes and Bioconvertions**, V5, London, Academic Press, 1980.245pp.

ROPER, J.C.; SARKAR, J.M.; DEC, J.; BOLLAG, J-M. Enhanced enzymatic removal of chlorophenols in the presence of co-substrate. **Wat. Res**, v.29, p.2720-2724, 1995.

SANKARAN, K.; VAND LUDWIG, C. H.. **Lignins, Occurrence, Formation, Structure and Reactions**. John Wiley and Sons, New York., 1971. 390pp.

SCHIRP, A.; FARRELL, R.L.; KREBER, B. Advances in understanding of the ability of saptaining fungi to produce cell-wall degrading enzymes. **Wood Fiber Sci**., v.35, p.434-444, 2003.

SERVILI M. A novel method for removing phenols from grape must. **Am. J. Enol. Vitic**., v.51, p.357-361, 2000.

SHARMA, H.S.S. Enzymatic degradation of residual non-cellulosic polysaccharides present on dew retted flax fibers. **Appl. Microbiol. Biotechnol**., v.26, p.358-362, 1987.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F.; DIAS, E.S.; WHEALS, A.E. Microbial diversity during maturing and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **Int. J. Food Microbiol**., v.60, p.251-260, 2000.

SOLOMON, E.I. Multicopper oxidases and oxigenases. **Chem. Rev**., v.96, p.2563-2605, 1996.

SOTO, C.G.; CHAMY, R.; ZUNIGA, M.E. Effect of enzymatic application on the borage (*Borago officinales*) oil extraction by cold pressing. **J. Chem. Eng**., v.37, p.326-331, 2004.

SUNNA, A.; ANTRANNIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol**., v.17, p.39-67, 1997.

SUUTARINEN, M.; MUSTRANTA, A.; AUTIO, K. The potential of enzymatic peeling of vegetable. **J. Sci. Food Agr**., v.83, p.1556-1564, 2003.

TECHAPIM, C.; POOSARAN, N; WATANABE, M. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulose free xylanase produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. **Process Biochem**., v.38, p.1327-1340, 2000.

WANG, P.; WOODWARD, C.A.; KAUFMAN, E.N. Poly(ethylene glycol)-modified ligninase enhances pentachlorophenol biodegradation in water-solvent mixtures. **Biotechnol. Bioeng**., v.64. p.290-297, 1999.

WANG, S.L.; YEN, Y.H.; SHICH, I.L. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. **Enzyme Microb. Technol**., v.33, p.917-925, 2003.

WOODWARD, J. Xylanases :functions, properties and applications. **Top. Enz. Ferment. Biotechnol**., v.8, p.9-30, 1984.

VIESTURS, U.; LEITE, M.; EISIMONTE, M.; EREMEEVA, T.; TRCIMANIS, A. Biological deiking technology for the recycling of office waste papers. **Biores. Technol**., v.67, p.225-265, 1999.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

YANG, C.Q.; ZHOU, W.L.; LICKFIELD, G.G. Cellulase treatment of durable press fineshed cotton fabric: Effects on fabric strength abrasion, resistance and handle. **Text Res. J**., v.73, p.1057-1062, 2004.

YING GUANG-GUO . Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates- a review. **Environm. Internat.**, v.28, p.215-226, 2002.

YOIN, K.S.; HONG, J.H.; BAE, D.H. Effective clarifying process of reconstituted apple juice using aid pretreatment. **J. Memb. Sci**., v.228, p.179-186, 2004.

Bol. SBCTA, 31 (2):249-260, jul/dez 1997

Artigo Técnico

PECTINASES, HEMICELULASES E CELULASES, AÇÃO, PRODUÇÃO E APLICAÇÃO NO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS: REVISÃO[1]

DA-SILVA[2], Roberto, FRANCO[2], Célia M.L. & GOMES[2], Eleni

RESUMO

Os componentes do sabor, aroma e cor de frutas e vegetais comestíveis estão localizados no conjunto de células parenquimáticas que compõem o mesocarpo das frutas. Cada célula é envolvida por estrutura complexa de proteção, denominada parede celular, que é composta de celulose, hemicelulose, pectina, lignina e proteína. Durante a moagem ou esmagamento de frutas esta parede é rompida permitindo a extração do suco com substâncias solúveis das células. As pectinases, celulases e hemicelulases promovem a degradação dos polissacarídeos das paredes, facilitando a extração e aumentando o rendimento. No processamento de sucos, a adição controlada de enzimas reduz a viscosidade, facilitando a clarificação e melhorando a concentração, a filtração e a estabilização de seus componentes. Os conhecimentos recentes sobre a estrutura da parede celular permitem procedimentos com enzimas a fim de degradar substâncias específicas presentes na parede em função do objetivo a ser alcançado: extração, clarificação ou concentração de sucos. Em função do grande número de formulações enzimáticas disponíveis e da diversidade de frutas utilizadas no processamento de alimentos há necessidade de conhecimento das particularidades dos substratos e das enzimas a fim de se obter bons resultados nestes processamentos. O objetivo desta revisão é mostrar aspectos da estrutura das frutas, das preparações enzimáticas, da ação das enzimas e de suas aplicações em diferentes processamentos de frutas e sucos.

Palavras-chave: *pectinases, celulases, hemicelulases, produção, processamento de alimentos.*

SUMMARY

PECTINASE, CELLULASE AND HEMICELLULASE – ACTION, PRODUCTION AND APPLICATION IN FOOD PROCESSING: A REVIEW. The components of the flavor, smell and color of edible vegetables and fruits are localized in a set of parenchyma cells which constitutes the mesocarp of the fruits. Cells are enclosed by an intricate framework of protection called cell wall which consists of cellulose, pectin, hemicellulose, proteins and lignin. When fruits are crushed or ground, the cell wall are disrupted allowing the extraction of juice and soluble components from the cell. Cellulase, pectinase and hemicellulase enzymes improve the breakdown of the cell wall polysaccharides, both facilitating the extraction of the juice and increasing the yield. In modern juice processing technology, the controlled addition of enzymes to the fruit juices reduces viscosity, leading to clarification and improving concentration, filtration and stability of the juice components. Recents advances in the knowledge regarding the structure of the cell wall allows an approach in which the use of specific enzymes can be used to degrade specific substances depending on goal one wishes: extraction, clarification or concentration of the juice. Considering the large number of enzymatic treatments available and the enormous volume of fruits nowadays processed, it is necessary to learn about the substrate particularities, the enzymes and their possible technological applications in order to optimize process yields. In this review, some aspects of the fruit structures, the actions of the enzymes and the enzymatic preparations will be examined together with their applications on different fruit and juice processing.

Key words: *pectinase, cellulase, hemicellulase, production, food processing*

1 Recebido para publicação em 27/12/96. Aprovado para publicação em 04/12/97

2 Departamento de Química e Geociências IBILCE/UNESP. São José do Rio Preto-S.P., C.P. 136, CEP 15.054-000
E-mail:dasilva@qeg.ibilce.unesp.br

1 — A ESTRUTURA VEGETAL

1.1 – Célula

Todos os organismos são constituídos de micro unidades chamadas células. Nas plantas, cada célula é constituída de uma parede celular, envolvendo a massa de protoplasma, que, por sua vez, contém suas próprias partes menores chamadas organelas, tais como núcleo, mitocôndrias e cloroplastos. A célula é também a estrutura física dentro da qual ocorrem o metabolismo e a reprodução da planta (1, 2, 42). Embora existam poucos tipos de células, a diferenciação entre elas é muito importante dentro de qualquer organismo composto de mais de uma célula, os chamados organismos multicelulares. Cada uma delas é especializada para uma determinada função. Esta divisão de trabalho permite que o organismo, como um todo, torne-se mais eficiente. Assim, nas frutas, enquanto as células da epiderme funcionam como barreira contra a penetração de água e insetos, as células do mesocarpo produzem compostos voláteis (aroma), açúcares e outros compostos de sabor que atraem animais que se alimentam de frutas, promovendo a dispersão das sementes e a propagação das espécies de plantas. Por outro lado, isto torna as frutas agradáveis ao paladar e por conseqüência, um produto comercial ou matéria-prima para a indústria alimentícia. A parte comestível das frutas (mesocarpo) é constituída de células parenquimáticas de armazenamento (23) que contém o suco e seus constituintes, tais como açucares solúveis, amido, pigmentos, vitaminas, dentre outros nutrientes (43). A parede destas células freqüentemente possui apenas a camada primária.

1.2 – Estrutura da Parede Celular

As paredes celulares não são uniformes; sua composição, forma e tamanho dependem da função da célula dentro do tecido da planta (43). Elas são estruturas complexas, constituídas de multicomponentes formando um emaranhado de polissacarídeos unidos por ligações intermoleculares (*Figura 1*). Apesar da estrutura química dos componentes individuais da parede já ter sido bem caracterizada, a proporção relativa de cada um deles é pouco conhecida, e desta forma, um entendimento completo da estrutura da parede celular vegetal está ainda para ser estabelecido (43). Numa descrição bem simples, pode-se dizer que a parede celular contém quatro componentes principais: celulose, polissacarídeos não celulósicos (PNC), proteínas e polifenóis (43).

Os PNC são divididos em polissacarídeos hemicelulósicos e pectínicos. Certas generalizações podem ser feitas sobre os tipos de polímeros encontrados em cereais (monocotiledôneas) comparados com outros vegetais comestíveis, como as hortaliças (dicotiledôneas). Pectinas e xiloglicanas são os principais PNC da maioria das hortaliças mas são encontradas em menores quantidades nos cereais, onde as β-glicanas são mais importantes (*Tabela 1*). A parede celular de uma célula parenquimática contém apenas a camada primária., formada de celulose, pectina, hemicelulose e algumas proteínas (42).

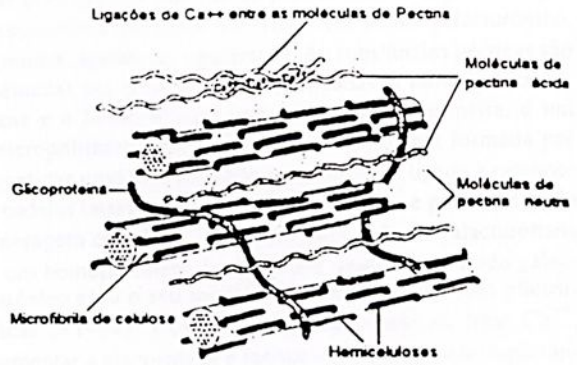


FIGURA 1. Estrutura da parede celular vegetal, segundo Alberts *et al.* (2).

TABELA 1. Composição das paredes celulares de cereais e vegetais.

Polímero	Composição (% Peso seco)	
	Cereais	hortaliças
Celulose	30	30
Pectina	5	35
Arabinoxilana	30	5
Glicanas com ligações mistas	30	ND
Xiloglicanas	4	25
Extensina	0.5	5

Ref. Mc DOUGALL *et al.* (43)

As hemiceluloses estão ligadas às microfibrilas de celulose formando estruturas resistentes que protegem a membrana plasmática e o protoplasma da célula. A parede de uma célula está aderida à parede de outra célula adjacente por meio de uma camada adesiva chamada lamela média, constituída principalmente de pectina. Em certas células, que devem ter a parede reforçada, aparece uma camada secundária entre a camada primária e a membrana plasmática. Esta é normalmente mais espessa e impregnada de lignina, muito mais resistente do que os outros componentes aos ataques de agentes químicos e de microrganismos (42). Uma leitura mais detalhada sobre a estrutura da parede celular pode ser encontrada no trabalho de McDougall *et al.* (43).

1.2.1 – Celulose

É um homopolímero de moléculas de glicose unidas por ligações glicosídicas β (1→4). As moléculas de celulose paralelas e adjacentes estão interligadas, por meio de pontes de hidrogênio formando microfibrilas muito resistentes. Assim, as fibras de celulose são formadas por regiões cristalinas e amorfas. A porção hidrolisável por enzimas é chamada de região amorfa e a porção resistente constitui a sua porção cristalina (10). A celulose nativa difere em sua cristalinidade quanto à localização na parede celular: a camada secundária contém celulose altamente cristalina enquanto a camada primária contém principalmente celulose amorfa.

1.2.2 – Hemiceluloses

Compreendem um grupo heterogêneo de polissacarídeos ramificados que se ligam firmemente, à superfície das microfibrilas de celuloses e entre si, cobrindo as microfibrilas e mantendo ligações cruzadas, via pontes de hidrogênio, em uma rede complexa. Quimicamente, os polímeros das hemiceluloses são heteropolissacarídeos formados por vários resíduos de açúcares como D-xilose, D-manose, D-arabinose e D-galactose, dentre outros e por seus ácidos urônicos (10, 31). Estes açúcares estão ligados entre si por ligações glicosídicas β(1→4) formando uma estrutura principal composta por um tipo específico de resíduos, a partir da qual surgem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares. Eles são classificados de acordo com o açúcar predominante na cadeia principal e na ramificação lateral. Assim, têm-se os seguintes polissacarídeos: xilanas, galactomananas, arabinoxilanas, galactosanas , ramnogalactosanas, etc. (31, 61). As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas mas concentram-se principalmente nas camadas primária e na secundária, onde estão intimamente associadas à celulose e lignina (10). A xilana é o principal polissacarídeo componente das hemiceluloses.

1.2.3 – Ligninas

São compostos polifenólicos altamente insolúveis formados pela polimerização de três precursores principais: álcool trans-p-coumaril, álcool-coniferil e álcool trans-sinapil. Elas mantêm uma extensa rede de ligações cruzadas dentro da parede celular dos troncos (madeira) conferindo-lhes elevada resistência (10).

1.2.4 – Proteínas

A parede celular vegetal contém proteínas estruturais (51) que desempenham papel importante na arquitetura da parede por meio de ligações cruzadas com outros componentes (43, 51). Dentre elas, a proteína melhor descrita é a extensina, que constitui aproximadamente 5% da camada primária dos vegetais dicotiledôneos, mas apenas cerca de 0.5% da dos cereais (*Tabela 1*). É uma glicoproteína constituída de cerca de 40% de hidroxiprolina e outros aminoácidos como de lisina, serina e tirosina. Este último está envolvido em ligações cruzadas com compostos fenólicos contribuindo para a insolubilidade da proteína na parede (9).

1.2.5 – Pectinas

São os principais componentes da lamela média e um dos principais polímeros da parede celular vegetal. Os polissacarídeos pécticos são ricos em ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. As substâncias pécticas são formadas por duas frações interligadas: a ramnogalacturonana e a homogalacturonana (43, 59). A primeira, é um heteropolimero que tem a estrutura principal formada por repetidas unidades de ácido galacturônico ligado à ramnose e cadeias laterais consistindo de arabinose e galactose e não interagem com Ca^{++}. Por outro lado, a homogalacturonana é um homopolímero formada por unidades de ácido galacturônico e/ou o seu metil éster unidos por ligações glicosídicas β(1→4). Devido à sua capacidade de ligar Ca^{++}, aumentar a viscosidade e formar gel ela apresenta importância tecnológica.

As homogalacturonanas podem ser divididas em dois grupos: ácido péctico ou poligalacturônico, designando as substâncias nas quais todos os grupos carboxílicos das unidades de ácido galacturônico estão livres, e ácidos pectínico ou pectinas, quando os grupos carboxílicos estão esterificados com o metanol. O grau de esterificação da pectina depende da fonte e do método de extração. Alguns tipos estão parcialmente acetilados nos carbonos das posições 2 ou 3 do ácido galacturônico (10, 20, 40, 59).

As pectinas contêm resíduos de ácidos galacturônicos carregados negativamente. Por causa destas cargas, esses polímeros são altamente hidratáveis e ácidas, podendo ligar-se iônicamente a cátions bivalentes. Quando Ca^{++} é adicionado a uma solução de pectinas de baixa metoxilação, estas formam ligações cruzadas entre si, por meio do íon, formando gel semi-rígido (40). Por estarem naturalmente presentes nas frutas, essas substâncias acabam por causar alguns problemas durante o processamento de sucos. Durante a extração do suco, as pectinas são dispersadas em solução juntamente com outros polissacarídeos, como as arabanas (44), promovendo queda no rendimento e aumento da viscosidade do suco, o que provoca entupimento de filtros e diminuição da velocidade de processamento (13). O suco assim obtido, apresenta qualidade inferior com respeito à cor e aos componentes aromáticos (23, 44). Além disso, a presença da pectina causa problemas de geleificação durante a concentração de sucos, dificultando a retirada da água (13, 44) e causando incrustações nas paredes do evaporador.

2 — AÇÃO DAS ENZIMAS

Enzimas são proteínas que aceleram certas reações químicas por promoverem um mecanismo alternativo, no qual a barreira da energia de ativação é menor do que na reação sem a sua presença (2). O uso de enzimas em proces-

sos de tecnologia de alimentos é vantajoso porque, dentre outras razões, elas são específicas, não necessitam de temperaturas elevadas para a reação e não formam subprodutos indesejáveis. A degradação dos principais polímeros constituintes da parede das células vegetais envolvem a participação de enzimas, cujas ações estão relacionadas abaixo.

2.1 – Celulases

A degradação de compostos celulósicos envolve a ação hidrolítica de várias enzimas que catalisam a quebra das ligações glicosídicas β(1→4) entre resíduos de D-glicose na molécula de celulose ou de seus derivados solúveis. Acredita-se que a degradação da celulose requer um complexo celulolítico envolvendo as quatro enzimas abaixo. Os trabalhos de Bisaria & Ghose (10) e Elisashvili (27) sugerem o mecanismo de ação, apresentado na *Figura 2*.

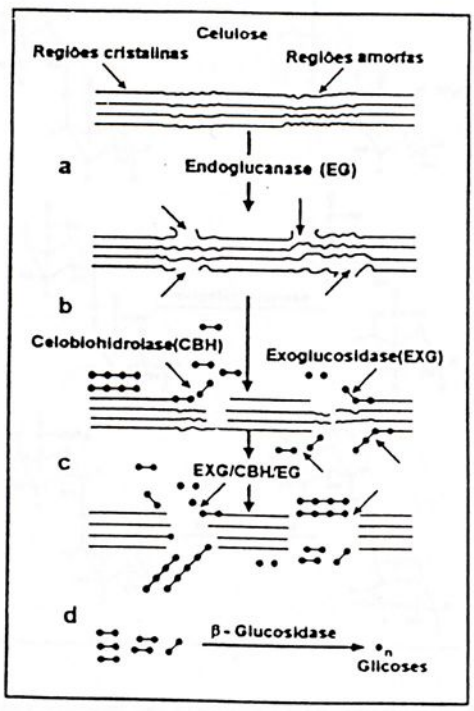


FIGURA 2. Representação esquemática da ação sinergística das celulases (adaptado de Bisaria & Ghose (10) e Elisashvili (27).

2.1.1 – Endoglucanase ou endo-1,4-β-glucanase (1,4-β-D glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2 .1.4)

Catalisa aleatoriamente a quebra das ligações internas nas regiões amorfas da molécula de celulose, liberando celo-oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização e celobiose. Da sua ação resultam também terminais livres para a ação da exoglucanase (61).

2.1.2 – Exoglucanase ou exo-1,4-β-glucanase ou celobiohidrolase (Cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91)

Catalisa a quebra seqüencial da segunda ligação glicosídicas a partir da extremidade não redutora da molécula de celulose, produzindo celobiose (61).

2.1.3 – Celobiase ou β-glucosidase (β-glucosidase, EC 3.2.1.21)

Catalisa a hidrólise da celobiose e numa velocidade menor, degrada também pequenos oligossacarídeos. Nos dois casos libera glicose (61).

2.1.4 – Exoglucosidase ou exo-1,4-β-glucosidase (1,4-β-D glucan-glucohydrolase, EC 3.2.1.74)

Catalisa a remoção de unidades de glicose a partir da extremidade não redutora da molécula de celulose. Este tipo de enzima tem sido encontrado em poucos microrganismos (27).

2.2 – Hemicelulases

Este nome não se refere a uma enzima específica mas a um grupo amplo de enzimas envolvidas na degradação das hemiceluloses. Uma vez que estas são constituídas de vários polímeros, formados por diferentes resíduos de açúcares, a sua degradação completa também necessita de enzimas específicas. As mais importantes e que já tiveram seus mecanismos descritos são citadas a seguir.

2.2.1 – Xilanase (1,4-β-D-xylan xylanhydrolase, EC 3.2.1.8)

É uma endo-enzima que degrada aleatoriamente a xilana, principal polímero das hemiceluloses constituído de unidades de D-xilose, liberando xilo-oligossacarídeos (61).

2.2.2 – β-xilosidase (exo-1,4-β-D-xylosidase, EC 3.2.1.37)

Catalisa a hidrólise de xilo-oligossacarídeos pela remoção seqüencial de resíduos de D-xilose a partir da extremidade não redutora (61).

2.2.3 – Arabinofuranosidase (α-L-arabinofuranoside arabinofuranohydrolase, EC 3.2.1.55)

Catalisa a hidrólise da ligação glicosídica do terminal não redutor nas arabinanas e outros polissacarídeos contendo arabinose (61).

2.2.4 – α-Galactosidase (α-D-galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.22)

Catalisa a hidrólise de galactomananas e outros poli e oligossacarídeos contendo galactose (61).

Bol. SBCTA, 31 (2):249-260, jul/dez 1997

2.2.5 – Mananase (endo-1,4-β-manosidase EC 3.2.1.78)

Catalisa a remoção de manoses a partir do terminal não redutor das mananas e outros polissacarídeos formados de resíduos de manoses (61).

2.3 – Enzimas pectinolíticas

Apesar da pectina conter outros açúcares em sua composição, o termo enzimas pectinolíticas usualmente se refere àquelas enzimas que catalisam a degradação das moléculas constituídas por unidades de ácidos galacturônicos. As pectinases são classificadas em desmetoxilantes e despolimerizantes (48), de acordo com seus mecanismos de ação (*Figura 3*).

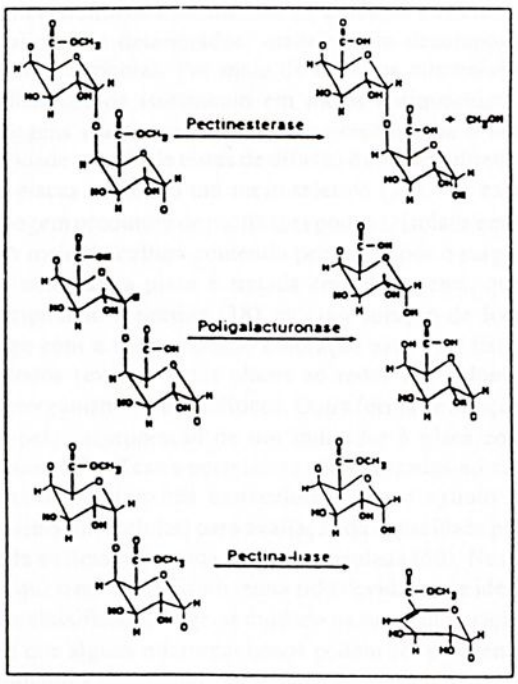


FIGURA 3. Ação das pectinases adaptado de Mac Millan & Sheiman (40).

2.3.1 – Pectinases despolimerizantes

Estas por sua vez, são subdivididas em hidrolases e liases.

2.3.1.1 – Poligalacturonase (Poly-α-1,4-galacturonide glycohydrolase, EC 3.2.1.15)

Hidrolisa de forma randômica as ligações glicosídicas internas entre os resíduos de ácidos galacturônicos, causando a despolimerização da molécula (48).

2.3.1.1.2 – Exo-poligalacturonase

Este grupo é subdividido em **Exo-PG-1** (Exo-poly-α-1,4-galacturonide glycohydrolase, EC 3.2.1.67) que hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poli galacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos galacturônicos livres e **Exo-PG-2** (Exo-poly-α-1,4-galacturonide glycohydrolase, EC 3.2.1.82) que hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos digalacturônicos livres (35, 48).

2.3.1.3 – Pectina-liase (Poly-α-1,4-D-methoxy-galacturonide lyase, EC 4.2.2.10)

É uma enzima despolimerizante , pertencente ao grupos das "liases", que quebra a ligação glicosídica entre os resíduos de ácidos galacturônicos por um mecanismo de trans-eliminação de hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 do ácido galacturônico. Sua ação é acompanhada por um aumento da absorvância a 235 nm devido à formação de dupla ligação entre aqueles carbonos, o que possibilita o monitoramento da atividade enzimática (48). Esta enzima degrada preferencialmente pectinas de alta metoxilação.

2.3.1.4 – Pectato-Liase ou Poligalacturonato-Liase

Enzima que tem ação similar à pectina-liase, porém atua sobre o substrato desmetoxilado (poligalacturonato). São subdivididas em **Exo-Pectato-Liase** (Exo-poly-α-1,4-galacturonide liase, EC 4.2.2.9) que hidrolisa as ligações do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando principalmente ácidos digalacturônicos insaturados livres e **Endo-Pectato-Liase** (Endo-poly-α-1,4-galacturonide liase, EC 4.2.2.2) que hidrolisa as ligações internas do ácido poligalacturônico, liberando oligogalacturonatos insaturados livres.

2.3.2 – Desmetoxilantes ou esterases

2.3.2.1 – Pectina esterase ou Pectinesterase (Pectin pectyl-hydrolase, EC 3.1.1.11)

Também conhecida como pectase, pectina metoxilase ou pectina metil-esterase, esta enzima remove grupos metoxílicos das substâncias pécticas e por isto é classificada como desmetoxilante (62). Esta enzima atua sobre a pectina de alta metoxilação e a transforma em pectina de baixa metoxilação liberando metanol e H^+. Este último, diminui o pH do meio, servindo como critério para avaliação da atividade enzimática (48). A pectina de baixa metoxilação liberada pode ser hidrolisada pela Poligalacturonase ou complexar com Ca^{++} e precipitar.

254 Bol. SBCTA, 31 (2):249-260, jul/dez 1997

3 — PRODUÇÃO DE ENZIMAS

3.1 – Seleção do microrganismo

Varios insumos alimentares são produzidos por microrganismos. Estes podem ser cultivadas em vários tipos de meios de cultura de baixo custo para a obtenção do metabólito desejado (33). Muitos microrganismos já foram isolados da natureza e utilizados industrialmente mas a maioria deles, potencialmente importantes, pode não ter sido ainda devidamente explorada. estima-se que apenas 5% dos fungos e 2% das bactérias tenham sido devidamente identificados (44). Mesmo que muitas linhagens tenham sido melhoradas geneticamente nos laboratórios, há sempre a possibilidade de que a natureza abrigue uma linhagem com maior potencial, seja na forma selvagem, seja por melhoramento genético.

No caso da seleção de microrganismos celulolíticos, hemicelulolíticos e pectinolíticos, as fontes tradicionais são os alimentos deteriorados, madeiras em decomposição e resíduos agrícolas. Por meio de métodos microbiológicos tradicionais de isolamento em meios enriquecidos, estas linhagens podem ser selecionadas medindo-se o nível de atividade através de testes de difusão da enzima diretamente em placas contendo um meio seletivo (34). Por exemplo, linhagem produtora de pectinases pode ser isolada em placas com meio de cultura contendo pectina. Após o surgimento das colônias, a placa é tratada com detergente, que atua precipitando a pectina (18) ou com solução de Iodo que reage com a mesma dando coloração azul (30) Estes dois métodos revelam halos claros ao redor das colônias dos microrganismos pectinolíticos. Outra forma de seleção pode ser pela incorporação de um indicador à placa contendo pectina (63). Testes posteriores são realizados no caldo de crescimento (enzima extracelular) ou no extrato celular (enzima intracelular) para avaliação da capacidade produtora da enzima procurada, pela cepa isolada (50). Nesta fase, até que o microrganismo tenha sido devidamente identificado e classificado, exige-se cuidado na sua manipulação, uma vez que alguns microrganismos podem ser patogênicos ou produtores de toxinas. Uma atenção especial é necessária com os fungos, uma vez que os esporos fúngicos são mais fáceis de disseminação do que leveduras e bactérias (50).

Assim que a linhagem produtora da enzima desejada tenha sido obtida, pode ser necessário modificar o organismo por meio de mutação ou engenharia genética a fim de melhorar a sua produtividade e o crescimento em meios de baixo custo. A principal preocupação é garantir que a capacidade de produção seja estável (50).

A síntese de pectinases, hemicelulases e celulases é uma propriedade que praticamente todos os microrganismos decompositores de madeiras e fitopatogênicos exibem. Eles diferem no tipo e quantidade em que as enzimas são produzidas. Assim, há os microrganismos que secretam uma ou duas das enzimas citadas e, mais raramente, os tipos que secretam todas as enzimas em referência.

Os fungos são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria para a produção de celulases e pectinases (44). Os principais microrganismos produtores das enzimas em estudo, citados na literatura, estão listados a seguir. **Pectinolíticos:** *Colletotrichum lindemuthianum*, *Trichoderma Koningii*, *Rhizoctonia fragariae*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Geotrichum candidum* (39). Entretanto, os principais gêneros representantes do grupo dos pectinolíticos são *Aspergillus* (26, 39), *Rhizopus* (26, 39), *Trichoderma* (26, 39), e *Penicillum* (5, 6, 30). **Celulolíticos:** *Trichoderma reesei* (também denominado *Trichoderma viride*) (10, 26, 27, 44), *Trichoderma Koningii* (10, 44) , *T. lignorum* (10), *Sporotrichum pulvurulentum* (também denominado *Chrysosporum lignorum*) (10), *Penicillium funiculosum* (10), *P. iriensis* (10), *Aspergillus* (10), *Fusarium* (10), *Schizophyllumm*, *Chaetomium* (10), *Humicola* (10, 21). **Xilanolíticos:** As xilanases são as principais hemicelulases estudadas. Elas são encontradas em várias bactérias tais como as dos gêneros *Bacillus* (10), *Bacteroides* (10), *Ruminococcus* (10), *Clostridium* (10) e Fungos dos gêneros *Myrothecium* (10, 21), *Aspergillus* (10, 21), *Trichoderma* (10, 21, 27), *Chaetomium* (10, 21), *Humicola* (10, 21) e *Penicillium* (10, 21). Algumas leveduras como as do gênero *Trichosporium* também produzem xilanases e celulases (58). Uma revisão detalhada sobre produção de celulases e xilanases por microrganismos encontra-se no trabalho de Elisashvili (27). As pectinases microbianas estão descritas na edição especial de Methods in enzymology de editado por Wood & Kellogg (62) e nos trabalhos de HENNIES (35) e FOGARTY & KELLY (32).

3.2 – Fermentação semi-sólida

A capacidade destes microrganismos crescerem em materiais ligno-hemi-celulósicos pode ser utilizada como uma forma de aproveitamento de resíduos vegetais. A matéria orgânica contida em resíduos agrícolas e agro-industriais, tais como farelo de trigo, casca de arroz, palha de milho, sabugo de milho, cascas e sementes de frutas, efluentes da fábrica de papel, bagaço de laranja e bagaço de cana de açúcar (33), aumenta dia a dia, tornando-se um problema com relação ao espaço para depósito e poluição do meio ambiente. Entretanto, tais resíduos representam uma fonte para crescimento microbiano para a produção de biomassa ou de enzimas. Na maioria dos casos, um simples enriquecimento destes compostos com uma fonte de nitrogênio, minerais ou vitaminas é suficiente para produção de quantidades significativas tanto de biomassa microbiana quanto de atividade enzimática (10, 27, 44).

Bol. SBCTA, 31 (2):249-260, jul/dez 1997

3.3 – Fermentação líquida

Os resíduos agrícolas também podem ser devidamente moídos ou triturados para servir como fonte de nutrientes, principalmente de carbono, na fermentação em meio líquido aerado. Este processo é também conhecido como fermentação submersa. A maioria das enzimas comerciais são obtidas por este processo, uma vez que os métodos modernos de controle de fermentação são mais facilmente adaptados ao mesmo. Assim, obtém-se rendimentos maiores e os custos e riscos de contaminação são reduzidos (30, 44).

4 — APLICAÇÃO NO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

4.1 – Mercado mundial de enzimas

O mercado anual para enzimas industriais é estimado em US$ 625 milhões, os EUA são os responsáveis pelo maior volume de comercialização (26). O *Quadro 1* apresenta a distribuição das enzimas por tipo e porcentagem comercializada na indústria de alimentos.

QUADRO 1. Distribuição mundial das enzimas nas indústrias de alimentos.

Distribuição da produção de enzimas por setor:	
62%	Indústria de alimentos
33%	Indústria de detergentes
5%	Indústria têxtil e de couros
Distribuição das enzimas produzidas por tipo de ação:	
80%	Hidrolases (principais para a indústria de alimentos
20%	Outras (oxirredutases, transferases etc.)
Distribuição das hidrolases:	
60%	Proteases
30%	Carbohidrases
3%	Lipases
7%	Outras
Distribuição das enzimas na indústria de alimentos (volume comercializado):	
Primeiro lugar	Processamento de amido
Segundo lugar	Processamento de leite
Terceiro lugar	Processamento de frutas e vegetais
Quarto lugar	Processamento de trigo e fermentações
Vantagens do uso de enzimas:	
Especificidade de reações:	Mínima produção de subprodutos
Condições moderadas de operações:	Economia
Alta eficiência:	Diminui tempo de reação

Fonte: DZIEZAK (26)

No Brasil, o mercado estimado para as enzimas α-amilase, coalho, papaína e pectinases é da ordem de US$ 17 milhões ao ano (15). As pectinases são utilizadas principalmente na indústria de suco de laranja ("pulp wash" e "core wash") e na clarificação do suco de limão concentrado, nestas indústrias, o mercado estimado de enzimas é da ordem de US$ 1 milhão (15). Entretanto, apesar da falta de dados na literatura, o mercado de pectinases deve ser bem maior se for levado em conta as aplicações na produção de vinhos, sucos de uvas e de frutas tropicais, que são significativas (15).

4.2 – Processamento de sucos, frutas e vegetais

O tecido das frutas é formado de células parenquimáticas cuja parede celular e lamela média são ricas em pectinas, celulose e hemiceluloses. As pectinas podem constituir até 4% do peso total da fruta (23). Quando a fruta é moída, a célula se rompe liberando a fase aquosa. Uma fração da pectina, chamada fração solúvel, distribui-se nessa fase aquosa (ou suco) e a outra fração, chamada insolúvel, permanece ligada à parede celular, compondo a polpa. Esta última fração atua como agente espessante na fabricação de geléia, por outro lado dificulta a liberação de líquido, baixando o rendimento na extração de sucos. A aplicação de enzimas nesse processo é fundamental para otimização da extração, rendimento, filtração e estabilidade da cor do produto (12, 48).

As preparações enzimáticas, denominadas comercialmente de "pectinases", são formuladas para conter um ou mais tipos de enzimas pectinolíticas dependendo do tipo de aplicação, além de atividades de celulases, hemicelulases, proteases e amilases (47), constituindo um "coquetel" enzimático (*Tabela 2*). O microrganismo mais usado para a produção destes preparados é o fungo *Aspergillus niger* (23, 54). A ação combinada das celulases, pectinases e hemicelulases no tratamento de produtos vegetais apresenta um efeito sinergístico que é vantajoso sob os aspectos de rendimento, operacionalidade e qualidade final do produto.

TABELA 2. Atividades glicanohidrolases de preparações comerciais.

Substrato (1%)	Atividade específica de algumas enzimas comerciais				
	Pectinex	Celluclast	Ultrazym	α-amilase	*A. niger**
Xilana	0.047	0.131	0.020	0.080	0.073
Pectina	0.323	0.049	0.153	0.030	0.110
Amido	0.320	0.027	0	0.270	0.133
CMC	0.057	0.096	0.30	0	0.080

Fonte: Sreenath & Santhanam (56) / *extrato bruto de uma linhagem selecionada.

Alguns cuidados são necessários com os constituintes da formulação enzimática, em função dos objetivos a serem alcançados. Se a meta é, por exemplo, aumentar o rendimen-

to da extração, a presença de todas as frações enzimáticas é favorável mas se o interesse é reduzir parcialmente a viscosidade de um suco, a presença de pectinesterase poderá resultar numa quebra excessiva da pectina, (veja descrição nos itens abaixo) diminuindo a viscosidade e causando floculações na presença de Ca^{++} (7).

A aplicação de enzimas nos processos de maceração, extração, concentração e clarificação de frutas e vegetais já foi descrita na literatura. Algumas destas matérias-primas são listadas a seguir: maçã (15, 26, 60), banana (52), manga (26), mamão (26, 36), abacaxi (26, 57), pêssego (26, 16), cenoura (52, 53), goiaba (13, 17), uva (15, 24, 54), ameixa (18), limão (15), laranja (15, 55), repolho (14) e subprodutos do suco de laranja ("pulp wash"e "core wash") (15). Em todos os casos, em menor ou maior grau, a qualidade do produto final foi melhorada.

4.2.1 – Extração

Frutas flácidas ou macias são especialmente difíceis de espremer por causa do alto teor de pectina. Devido à alta viscosidade, estes sucos aderem à polpa numa estrutura semigeleificada amorfa e são difíceis de serem recuperados mecanicamente. Pela adição da enzima à polpa, a estrutura do gel entra em colapso, a viscosidade é reduzida e o suco é mais facilmente recuperado (23). A extração de sucos através da maceração enzimática pode produzir um aumento no rendimento acima de 90%, comparado ao processo mecânico convencional, além das melhorias das características organolépticas (cor, sabor), nutritivas (vitaminas) e tecnológicas (melhor filtração) do suco (49). Após a extração, a polpa pode ser liquefeita usando uma combinação de pectinase, celulase e hemicelulase (xilanase). Estas enzimas agem sinergísticamente sobre a parede celular das frutas, degradando-a (22). Alguns defeitos que aparecem nos sucos durante a estocagem são devidos à presença de amido, que retrograda, separando-se da fase aquosa durante o resfriamento, ou de arabinanas (polímeros de arabinoses também conhecidos como arabanas) (23, 26) que têm baixa solubilidade em sucos concentrados (26). Estes polissacarídeos podem ser eliminados pelas enzimas amilases e arabinosidases, que normalmente estão presentes nas formulações comerciais.

Em sucos cítricos, de tomates e de maçãs é essencial que a pectina não seja totalmente degradada a fim de manter a cor característica estável em suspensão. É preciso evitar a ação da pectina esterase que pode desmetoxilar a pectina solúvel, produzindo ácido péctico, que se complexa com o íon de cálcio presente, formando pectato de cálcio que por sua vez, flocula, levando a uma perda de cor (23). Este fato é mais preocupante no caso da produção do suco concentrado, o qual deverá ser reconstituído posteriormente. O problema pode ser contornado pela adição de endopoligalacturonase que, sob condição de atuação controlada, degrada parcialmente a fração da pectina desmetoxilada até um certo grau, impedindo a coagulação do pectato com o íon cálcio e a perda da cor, por floculação (7, 40,).

4.2.2 – Clarificação

A turbidez dos sucos se deve à presença de vários componentes em suspensão, tais como proteínas e polifenóis, em um estado coloidal estável com as pectinas. Em muitos tipos de sucos, em particular os cristalinos, a clarificação é necessária para manter a uniformidade do produto, tornando-o atraente ao consumidor (56). Na primeira fase da clarificação este sistema coloidal deve ser desestabilizado. Isto ocorre pela ação de hidrolases do próprio suco ou pela ação de enzimas comerciais adicionadas ao mesmo. Cerca de 5-10% das ligações glicosídicas da pectina precisam ser rompidas para uma redução da viscosidade suficiente para a desestabilização do sistema (7). Os preparados enzimáticos para clarificação consistem numa mistura de enzimas específicas para esta finalidade incluindo, além das pectinases, outras como amilases, proteases e arabinosidases (44). Estes preparados têm uma composição diferente daqueles destinados apenas à extração. Portanto, nesta primeira fase, as pectinases degradam a pectina reduzindo a viscosidade.

Na segunda fase, as substâncias causadoras de turbidez (polifenóis), desestabilizadas, agregam-se por atração de cargas elétricas intermoleculares. Finalmente, no terceiro estágio, ocorre a sedimentação destes agregados (23, 39), cuja velocidade é determinada pela lei de Stoke, sendo uma função do tamanho e da densidade das partículas formadas no estágio anterior (7). Este processo é melhorado pela adição de agentes clarificantes (gelatinas, bentonita, silicasol etc.). A redução dos teores de polifenóis nos sucos submetidos à despectinização enzimática está descrita em trabalhos disponíveis na literatura (7, 52, 56) . Todos os mecanismos propostos para explicar a clarificação envolvem a atuação imprescindível da pectina esterase (3, 4).

O processo de clarificação do suco de maçã foi estudado por Endo (28). Para que ela ocorra, é necessária a ação conjunta de pelo menos duas enzimas, a poligalacturonase e a pectina esterase. A poligalacturonase sozinha não degrada a pectina da maçã que tem um grau de metoxilação de até 90% (60). Por isto, é necessária a ação inicial da pectina esterase, desmetoxilando a pectina e deixando-a em condição de ser degradada pela poligalacturonase. Resultados obtidos em estudos com manga (29) confirmaram o efeito sinérgistico da atuação das duas enzimas. Em outro trabalho, Park *et al.* (45) estudando o efeito das pectinases de diferentes microrganismos na clarificação de sucos de frutas observaram que não houve correlação entre a redução de viscosidade, a produção de substâncias redutoras e a clarificação dos sucos, sob a ação das enzimas. A redução da viscosidade do suco torna as operações de filtração, clarificação e concentração mais eficientes. Na indústria de suco de maçã, este processo é aplicado amplamente para melhorar a qualidade final do suco (37). Na indústria cítrica, as enzimas também

Bol. SBCTA, 31 (2):249-260, jul/dez 1997

são usadas, particularmente em suco de limão, na extração de óleos essenciais e na produção de extratos concentrados turvos usados na fabricação de refrigerantes (44). A clarificação de suco de uva branca por meio de uso de pectinase comercial foi relatada por Sreenath & Santhanam (56), obtendo uma clarificação de 98-99% com uma redução na viscosidade e fenóis totais da ordem de 25% e 32%, respectivamente. A aplicação de uma mistura comercial de hemicelulases e pectinases (Rohament K-Rohm Tech, Inc.) resultou em melhora da cor do suco de cenoura, previamente aquecido para inativar a pectinesterase, sem afetar a turbidez típica. A melhora da cor foi atribuída à maior extração de _-carotenos durante a prensagem (52, 53). Isto ocorreu devido à despolimerização dos polissacarídeos da parede celular (41), facilitando a extração dos β-carotenos.

4.2.3 – Concentração

A clarificação por despectinização enzimática é também importante para o suco que vai ser concentrado para evitar a geleificação. Acima de uma certa concentração de sólidos ocorre geleificação do suco não despectinizado. No caso do tomate por exemplo, é impossível obter o extrato concentrado se não houver a degradação da pectina, que pode ocorrer pela ação das enzimas da própria fruta fazendo-se o processamento a frio (7). Por outro lado, a pectina não deve ser degradada na produção do suco do tomate a fim de reter sua cor característica, fazendo-se, neste caso, o processamento a quente (40). Dziezak (26) cita trabalho onde foi diminuída a viscosidade de uma pasta de tomate com uma mistura de hemicelulases e celulases, aumentando o rendimento em 70% durante a secagem por aspersão (spray drying), sem a perda da cor vermelha do tomate (26).

4.2.4 – Vinificação

Um cuidado especial deve ser dado ao emprego de enzimas na vinificação. Os componentes extraídos devem ser preservados ao longo da maturação, que pode levar anos. Os formulados enzimáticos devem levar em conta as peculiaridades do processamento do vinho. No processamento de frutas, após desenvolverem sua ação, as enzimas são desnaturadas por pasteurização. Entretanto, no processo de vinicultura este tratamento térmico não acontece, e por isto os preparados enzimáticos devem ser específicos para este processo, permitindo uma boa maturação. As preparações de pectinases são aplicadas à tecnologia de vinhos para melhorar tanto a clarificação do vinho branco quanto a cor no vinho tinto (44). Neste caso, é possível a formação de concentração elevada de compostos fenólicos no vinho final prejudicando o sabor. Isto se dá por causa da atividade da cinamoil esterase presente nas preparações enzimáticas. Esta enzima é capaz de produzir ácido cinâmico a partir de ésteres de ácido p-coumariltartárico e cafeoil. O ácido cinâmico por sua vez é descarboxilado pela ação de descarboxilases produzidas por *Saccharomyces cerevisae* durante a fermentação, resultando na formação dos componentes fenólicos desagradáveis (24). Assim, a presença de enzimas indesejáveis numa formulação mista comercial deve ser evitada (4). Um tipo de celulase, a β-glucosidase, vem mostrando um grande potencial de aplicação no processo de vinicultura. Ela hidrolisa os glicosídeos monoterpenos de sabor desagradável, liberando monoterpenos flavorizantes e melhorando o aroma e o sabor do vinho (23). Outro problema do vinho é a contaminação da uva com o fungo *Botrytis cinerea*, produtor de β-glicanas que obstruem os filtros, prejudicando a filtração e dificultando a clarificação. Preparados enzimáticos especiais contendo β-glicanase altamente específica para hidrólise das β-glicanas estão disponíveis comercialmente (44).

4.2.5 – Indústria cítrica

O suco da laranja é obtido por meio de extratoras que cortam e prensam a laranja separando albêdo, casca e membranas dos gomos do restante do suco, que é, então recuperado por meio de um tubo coador. Este líquido é ainda rico em materiais insolúveis provenientes das paredes das células (vesículas) de sucos que são extraídos juntamente com o caldo. A retirada deste material, por meio de filtração (finisher), é importante para a qualidade final do suco de laranja. O resíduo obtido constitui uma polpa que ainda retém boa quantidade de suco o qual é recuperado em até três lavagens sucessivas. Após as lavagens obtém-se um suco com cerca de 3° Brix (o suco primário tem cerca de 11° Brix), que é então levado a um tanque de reação enzimática onde é submetido à ação da pectinase. Neste processo a enzima indicada é a endopoligalacturonase que baixa rapidamente a viscosidade do suco.

Após a despectinização o suco é submetido à evaporação podendo ser concentrado até 65° Brix, sem problemas de geleificação ou encrustamento no evaporador. Este suco concentrado recebe o nome de "pulp wash", é rico em limonina e tem sabor amargo, sendo assim de qualidade inferior. Tem, entretanto valor comercial, já que corresponde a 5-6% do volume do suco de laranja processado na fábrica. Ele é empregado como base cítrica nas indústrias de bebidas (15). Também na indústria de suco de limão a aplicação de misturas de pectinases é importante para uma boa qualidade do suco clarificado. Neste caso a enzima deve ser ativa em pH baixo e uma mistura de endopoligalacturonase e celulase é recomendada para melhorar o rendimento e a clarificação do suco de limão (15)

4.2.6 – Cervejaria

Durante o processo de maltagem são extraídas β-glicanas e pentosanas, originadas da parede celular das células do endosperma da cevada. Estes polissacarídeos aumentam a viscosidade do mosto e dificultam a sua filtração. A estabilidade coloidal da cerveja no resfriamento também fica afetada porque as β-glicanas são insolúveis em certas concentrações de álcool e podem precipitar (44). β-glicana-

ses microbianas (*Bacillus subtilis*) são comercialmente disponíveis (23). Estas enzimas são termoestáveis e específicas para hidrólise das β-glicanas produzidas durante a maltagem (23).

4.2.7 – Panificação

A farinha de trigo contém cerca de 2-3% de pentosanas, polissacarídeos compostos principalmente de D-xilose e L-arabinose. Estes polissacarídeos existem na forma solúvel e insolúvel. A forma solúvel melhora a qualidade do pão. As pentosanas insolúveis, entretanto, impedem o desenvolvimento do glúten que é de vital importância na formação da estrutura do pão e, conseqüentemente, reduzem o volume e prejudicam a textura do mesmo (26). Aplicação de pentosanases (xilanase/arabinosidases) à farinha leva à degradação das pentosanas, melhorando o manuseio da massa e dando um produto final com maior volume e melhor estrutura do miolo (44). A mistura de pentosanases e β-glucanases também melhora a qualidade do pão-de-fibra (baixa caloria). Essas enzimas hidrolisam as pentosanas e β-glucanas de cereais, resultando com isso, em um melhor manuseio da massa, redução no ressecamento e no tempo de mistura, além de um aumento no volume do pão (26).

4.2.8 – Extração de óleo

A utilização de celulase e pectinase para reduzir perdas durante a extração de óleo de palmeira foi relatada por Bouvier & Entressangles (11). Essas enzimas degradam componentes de parede presentes na polpa facilitando a extração do óleo. A adição de celulase ao mesocarpo reduz a perda durante a prensagem da fibra e durante a clarificação de 3 e 18%, respectivamente, comparado ao processo convencional sem uso de enzima. Estas enzimas são também empregadas na extração de azeite-de-dendê e de oliva (15).

4.3 – Outras aplicações industriais

4.3.1 – Indústria de celulose e papel

As hemicelulases, especialmente a xilanase, podem auxiliar na diminuição da poluição ambiental causadas pelas indústrias de celulose e papel. Nestas indústrias, o cloro é usado na forma de agente químico branqueador mas resulta em produtos residuais chamados compostos orgânicos clorados, nocivos ao meio ambiente.

A xilanase vem sendo empregada no processo de biobranqueamento da polpa Kraft, a fim de diminuir a concentração do cloro necessário no processo. Isto tem a função principal de diminuir a taxa de organoclorados produzidos nos efluentes desta indústria, que são lançados nos rios, poluindo-os. A xilanase degrada a xilana que liga a lignina à celulose e também a xilana que se deposita sobre a lignina após o cozimento com a redução do pH da pasta. Com esta ação, há uma melhor extração da lignina aderida à celulose, além de um favorecimento da acessibilidade do cloro à fração de lignina para oxidá-la, solubilizando-a e, conseqüentemente, levando à sua extração, deixando a polpa com grau de alvura adequado à fabricação do papel (24). O uso destas enzimas permite uma redução de 30% na quantidade de cloro usado (21). No futuro, este percentual de redução poderá ser aumentado, por meio de novas formulações enzimáticas mais eficientes (24).

4.3.2 – Indústria têxtil

A presença da pectina na parede celular do caule de plantas superiores, é responsável pela forte aderência entre estas células (38). A adição de pectinases no tratamento de fibras brutas vegetais causa a degradação da pectina e a consequente separação das células da planta. Este fenômeno é conhecido como maceração e resulta em separação das fibras de celulose da parede celular. Este processo vem sendo estudado visando sua de aplicação na degomagem de produtos de fibras naturais, tais como o rami, pela indústria têxtil (5,6).

7 — REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. Macromolecules: structure, shape and information.In: *Molecular biology of the cell*. 2th ed. New York: Garland, p. 87-134, 1989.

2. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. Special features of the plant cells.In: *Molecular biology of the cell* 2th ed. New York: Garland, p. 1137-1186. 1989.

3. AMSTALDEN, L.C., MONTGOMERY, M.W. Pectinesterase em suco de laranja: caracterização. Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 14, p. 37-45, 1994.

4. BAKER, R.A., BRUMMER, J.H. Pectinase stabilization of orange juice cloud. J. Agric. Food Chem., v. 20, p. 1169-1173, 1972.

5. BARACAT, M.C., VALENTIM, C., MUCHOVEJ, J. J., SILVA, D.O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. Biotechnol. Lett., v. 2, p. 899-902, 1989.

6. BARACAT-PEREIRA, M.C.; COELHO, J.L.C., SILVA, D.O. Production of pectin lyase by *Penicillium greseoroseum* cultured on sucrose and yast extract for degumming of natural fibres. Lett. Appl. Microbiol., v. 18, p. 127-129, 1994.

7. BAUMANN, J.W. Application of enzymes in fruit juice technology. In: BIRCH, G.C.; BLAKEBROUGH, N., PARKER, K.J. (Ed.). *Enzymes and food processing*. London: Applied Science Publishers, 1981. p. 129-147.

8. BIELY, P. Microbial Xylanolytic sistems. Trends. Biotechnol., v. 33, p. 286-290, 1985.

9. BIGGS, K.J., FRY, S.C. Solubilization of covalently bound extensin from *capsicum* cell walls. **Plant physiol.**, v. 92, p. 197-204, 1990.

10. BISARIA, V.S., GHOSE, T.K. Biodegradation of Cellulosic Materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme Microb. Technol.**, v.3, p.90-104, 1981.

11. BOUVIER, F., ENTRESSANGLES, B. Utilization of cellulases and pectinases in the extraction of palm oil. **Rev. Fr. Corps Gras**, v. 39, p. 245-252, 1992.

12. BOYLE, F.P., SHAW, T.N., SHERMAN, G.D. Efficient extraction single strenght technique open up wide uses for new passion fruit juice. **Food Eng.**, v. 27, p. 94-97, 1986.

13. BRASIL, I.M., MAIA, G.A., FIGUEIREDO, R.W. Estudo do rendimento do suco de goiaba extraído por tratamento enzimático. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 16, p. 57-61, 1996.

14. BUCKENHUESKES, H., OMRAN, H., CHI, Z., GIERSCHNER,K. Investigations on enzymatic liquefaction of red and white cabbage. **Food Biotechnol.**, v.4, p. 291-299, 1990.

15. CANTO, W. L. , MENEZES, T.J.B. Produção, usos e mercado de enzimas. In: Estudos econômicos - Alimentos processados. Ed. Campinas: ITAL - Secretaria de Agricultura Abastecimento - Coordenadoria de Pesquisas agropecuária - ITAL. Nº 29, 1995.

16. CESARE, L.F., NANI, R., FORNI, E., SCOTTO, P. Influence of pectolytic enzymes on the flow rate and flavouring of peach juice. **Fluessiges Obst**, v. 60, n. 7, (Fruit processing) v. 3, p. 254-258, 1993.

17. CHAN, W.Y., CHIANG, B.H. Production of clear guava nectar. **Int. J. Food Sci. & Technol.**, v. 27, p. 435-441, 1992.

18. CHANG, T.S., SIDDIQ, M., SINHA, N.K., CASH, J.N. Commercial pectinases and the yield and quality of stanley plum juice. **J. Food Process Preserv.**, v. 19, p. 89-101, 1995.

19. CHESSON, A. A review - Maceration in relation to the post-harvest handling and processing of plant material. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 48, p. 1-45, 1980.

20. DASILVA, R. *Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de Humicola 179-5 e aplicação dessas enzimas*. Campinas, 1992. Tese Doutorado na Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

21. DASILVA, R.; YIM, D.K., PARK, Y.K. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp for pulp improvement. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 77, p. 109-111, 1994.

22. DE LEO, P., TRAVERSI, D., MICELI, A. Synergic effects of cellulase, pectinase, and hemicellulase on cell wall hydrolysis. **Food Hydrocolloids**, V. 5, p. 223-224, 1991.

23. DEKKER, R.F.H. Enzymes in food beverage processing - 2. **Food Aust.**, v. 46, p. 179-181, 1994.

24. DUGELAY, I., GUNATA, Z., SAPIS, J.C., BAUMES, R., BAYONOVE, C. Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. **J. Agric. Food Chem.**, v. 41, p. 2092-2096, 1993.

25. DURÁN, N., ESPOSITO, E., NETO, J.S.A. Enzimas de importância na indústria de celulose e papel. **Papel**, v. 56, n. 12, p. 68-85, 1995.

26. DZIEZAK, J.D. Enzymes: catalysts for food processes. **Food Technol.**, v. 45, p. 78-85, 1991.

27. ELISASHVILI, V.I. Biosynthesis and properties of Cellulases and Xylanases of higher Basidiomycetes (Review). **Appl. Biochem. Microbiol.** v.29, p.257-266, 1993.

28. ENDO, A. **Agri. Biol. Chem.**, v.28, p.757-64, 1964

29. FARIA, J.B., CAVALCA, M.M., FERREIRA, R.C., JANZANTI, N.S. Transformações enzímicas das substâncias pécticas da manga (*Mangifera indica*) v. Haden no amadurecimento. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 14, p. 189-201, 1994.

30. FERNANDES-SALOMÃO, T. M., AMORIN, A. C. R., CHAVES-ALVES,V. M., COELHO, J. L. C., SILVA, D. O., ARAÚJO, E. L. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 15-18, 1996.

31. FERREIRA-FILHO, E.X. The Xylan-degrading enzyme system. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 1093-1108, 1994.

32. FOGARTY, W. M., KELLY, C. T. Developments in microbial extracellular enzymes. IN: WISEMAN, A. (ed.) Topics in enzyme and fermentation biotechnology. Chichester: Ellis Horwood, 1979. v. 3, cap. 3, p. 60 - 67

33. GARZÓN, C.G., HOURS, R.A. Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. **Bioresource Technol.**, v. 39, p. 93-95, 1993.

34. HANKIN, L., ZUCKER, M., SANDS, D.C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Appl. Microbiol.**, v. 22, p. 205-209, 1971.

35. HENNIES, P. T. Produção de pectinase de *Penicilium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido Campinas 1996. Tese se dissertação de mestrado na Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas

36. HERMOSILLA, M. J., PEREZ, W. M., MOREN, C. J., LOOZE, Y. Enzymic hydrolysis of papaya pulp **Alimentos**, v. 16, p. 5-8, 1991.

37. KILARA, A. Enzymes and their uses in the processed apple industry: a review. **Process Biochem.**, v. 17, p. 35-41, 1982.

38. KRAVTCHENKO, T.P., VORAGEN, A.G.J., PILNIK, W. Analytical comparison of three industrial pectin preparations. **Carbohydr. Polym.**, v. 18, p. 17-25, 1992.

39. LEUCHTENBERGER, A., MAYER, G. Changed pectinase synthesis by aggregated mycelium of some *Aspergillus niger* mutants. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 14, p. 18-22, 1992.

40. MACMILLAN, J.D. SHEIMAN, M.I. Pectic enzymes. *Advanced Chemical Series*, v.136, p. 101-130, 1974.

41. MASSIOT, P., GUILLER, I., BARON, A., DRILLEAU, J.F. Cell Wall. Polysaccharides modifications during heat treatment and enzymatic degradation of carrot tissues. **Lebensm. Wiss.Technol.** v. 25, p. 559-563, 1992.

42. MAUSETH, J.D. Plant structure. In: *Botany an introduction to plant biology*. San Francisco, Saunders College, 1991, p. 49-82.

43. McDOUGALL, G.J., MORRISON, I.M., STEWART, D., HILLMAN, J.R. Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. **J. Sci. Food Agric.**, v. 70, p. 133-150, 1996.

44. Novo Nordisk. A ação das enzimas. Bioindustrail Group - Novo Nordisk, Novo Allé, 2880 - Bagsvaerd, Dinamarca.(Araucária , PR - Brasil)

45. PARK, Y.K., FUJUKI, E., LIMA, D. C. Produção de enzimas pectinolíticas por fungos I- Isolamento de microrganismos do solo e atividades das enzimas na clarificação de sucos de varias frutas. **Rev. Bras. Tecnol.** v. 3, p. 197-203, 1972.

46. PATHAK, A.N., GHOSE T.K. Cellulases-1: sources, technology. *Proc. Biochem.* Ap, 35-38, 1973.

47. PETER, J. Enzymic treatment of tropical fruit for improvement of concentration capability and sediment stability of the pulp and juice. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v. 19, p. 81-87, 1986.

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

49. ROMBOUTS, F.M., PILNIK, W. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. **Process Biochem.**, v. 18, p. 9-13, 1978.

50. SHEPPARD, G. The production and uses of microbial enzymes in food processing. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 23, p. 237-283, 1986.

51. SHOWALTER, A.M. Structure and function of plant cell proteins. **Plant cell**, v. 5, p. 9-23, 1993.

52. SIMS, C.A., BALABAN, M.O., MATHEWS, R.F. Color and Cloud Stability improvement of carrot juice. **Proc. Fla. State Hortic. Soc.** v. 106, p.243-246, 1993.

53. SIMS, C.A.; BALABAN, M.O., MATHEWS, R.F. Optimization of carrot juice color and cloud stability. **J. Food Sci.** v. 58, p. 1129-1131, 1993.

54. SIMS, C.A., BATES, R.P. Challenges to processing tropical fruit juices: banana as an example. *Proc. Fl. State Hortic. Soc.*, v. 107, p. 315-319, 1994.

55. SOLEHAH, A., BALAUMANI, V. T., DAS, K., AMIZA, M. A. Enzymes for improved extraction and stabilization of colour and flavour of orange juice. **J. Food Sci. Technol. Indian**, v. 31, p. 508-510, 1994.

56. SREENATH, H.G., SANTHANAM, K. The use of commercial enzymes in the white grape juice clarification. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 73, p.241-243, 1992.

57. SREENATH, H.K., SUDARSHANAKRISHNA, K.R., SANTHANAM K. Improvement of juice recovery from pineapple pulp/residue using cellulases and pectinases. **J. Ferment. Bioeng**. v. 78, p.486-488, 1994.

58. STEVENS, B.J.H., PAYNE, J. Cellulase and Xylanase production by yeast of the genus *Trichosporon*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 100, p. 381-393, 1977.

59. THAKUR, B.R., SINGH, R.K., HANDA, A.K. Chemistry and uses of pectin - A review. *Crit. Rev.* **Food Sci. Nutrit.**, v. 37, p. 47-73, 1997

60. WOSIACKI, G.; CHIQUETTO, N.C., KIRCHNER, C.L. Avaliação do uso da maçã nacional (*Malus domestica*) para fins industriais. Parte II - Características de qualidade de sucos clarificados de cinco variedades: Anna, Gala, Ohio Beauty, Pome-3 e Rainha, colhidas na safra 1989/90. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 12, p. 160-173, 1992.

61. WOOD, W.A.; KELLOGG, S.T. *Biomass:* part A - Cellulose and hemicellulose, *Methods in enzymology*, v. 160, 1986.

62. WOOD, W.A., KELLOGG, S.T. *Biomass:* part B - Lignin, pectin and chitin. *Methods in enzymology*, v. 161, 1986.

63. ZIMMERMAN, R.E. A. Rapid assay for pectinesterase activity which can be used as a prescreen for pectinesterase inhibitors. **Anal. Biochem.**, v. 85, p. 219-223, 1978.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

ISSN 0001-3714

SCREENING OF BACTERIAL STRAINS FOR PECTINOLYTIC ACTIVITY: CHARACTERIZATION OF THE POLYGALACTURONASE PRODUCED BY *BACILLUS* SP

Márcia M.C.N. Soares; Roberto da Silva; Eleni Gomes*

Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Submitted: November 30, 1998; Returned to authors for corrections: July 29, 1999; Approved: August 26, 1999

ABSTRACT

One hundred sixty eight bacterial strains, isolated from soil and samples of vegetable in decomposition, were screened for the use of citrus pectin as the sole carbon source. 102 were positive for pectinase depolymerization in assay plates as evidenced by clear hydrolization halos. Among them, 30% presented considerable pectinolytic activity. The cultivation of these strains by submerged and semi-solid fermentation for polygalacturonase production indicated that five strains of *Bacillus* sp produced high quantities of the enzyme. The physico-chemical characteristics, such as optimum pH of 6.0 – 7.0, optimum temperatures between 45°C and 55°C, stability at temperatures above 40°C and in neutral and alkaline pH, were determined.

Key words: *Bacillus* sp, polygalacturonase, pectinolytic activity

INTRODUCTION

Many plant-pathogenic bacteria and fungi are known to produce pectolytic enzymes useful for invading host tissues. Moreover, theses enzymes are essential in the decay of dead plant material by nonpathogenic microorganisms and thus assist in recycling carbon compounds in the biosphere (2).

Pectinases include depolymerizing and demethoxylating enzymes. Depolymerizing enzymes are polygalacturonase (EC 3.2.1), which cleaves the α-1,4 glycosidic bonds between two galacturonic acid residues, and pectin-lyase (EC 4.2.2), which catalyses a β-elimination reaction between two methylated residues (3). De-esterifying enzymes include pectin-esterase (EC 3.1.1), which catalyses the demethoxylation of methylated pectin, producing methanol and pectin (20).

Preparations containing pectin-degrading enzymes have been extensively used to improve the stability of fruit and vegetable nectars and in the clarification of fruit juices and wines (5, 13, 21, 23, 24). Currently, they are widely used in industry for retting of natural fibers and extraction of oils from vegetable and citrus peels (4, 6).

The enzymes preparations used in the food industry are of fungal origin because fungi are potent producers of pectic enzymes and the optimal pH of fungal enzymes is very close to the pH of many fruit juices, which range from pH 3,0 to 5,5 (26). Such preparations are not suited for production of vegetable purées or other preparations in which pH

* Corresponding author. Mailing address: Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, C.P. 136, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP. E-Mail: eleni@bio.ibilce.unesp.br

values are close to neutral (7). Furthermore, due to the relatively low temperature stability of the fungal enzyme preparations, maceration needs to be carried out at temperatures not exceeding 45°C, necessitating the incorporation of a pasteurization step to limit the growth of mesophilic microorganisms (22).

The present investigation was on pectinolytic activities of bacteria strains isolated from Brazilian soil and samples of vegetable in decomposition.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms: portions of 5g of samples of soil, from agricultural and vegetable wastes were pooled and homogenized in sterile medium with pH 6.0 containig 1% citrus pectin with 67% of metoxilation, 0.14% $(NH_4)_2SO_4$, 0.20% K_2HPO_4, 0.02% $MgSO_4$ $7H_2O$ and 0.10% nutrient solution (5 mg/L $FeSO_4.7H_2O$; 1.6 mg/L $MnSO_4.H_2O$; 1.4 mg/L $ZnSO_4.7H_2O$; 2.0 mg/L $CoCl_2$). A loop of the homogenate was then streaked onto nutrient medium and incubated at 30°C for 24 to 72h. All morphological contrasting colonies were purified by repeated streaking. Pure cultures were sub-cultured onto slants media and maintained for identification and enzymes studies. Identification of the genus was based on morphological and biochemical characteristics (15).

Plate assay of depolimerized pectin: The medium was the same used for isolation of cultures, supplemented with 2% agar. Pure culture was inoculated by puncture in the medium and incubated for 48h at 30°C. After the colonies reached around 3 mm, iodine-potassium iodide solution (1.0g iodine, 5.0g potassium iodide and 330ml H_2O) was added to detect clearance zones (11).

Production of pectic enzyme on solid-state (SSF) and submerged (SmF) fermentation: Strains presenting large clearing zones were used for enzyme production assays on liquid and solid medium. The liquid medium containing 1% citrus pectin, 0.14% $(NH_4)_2SO_4$, 0.6% K_2HPO_4, 0.20% KH_2PO_4 and 0.01% $MgSO_4$ $7H_2O$, pH 6.0 was inoculated with a suspension containing 10^6 cells/ml. Cultures were grown in 125ml Erlenmeyers flasks with 25 ml of medium in a rotary shaker (150rpm) at 30°C. After 48h the biomass was separated by centrifugation at 1000xg for 20 min and the supernatant was used to evaluate polygalacturonase (PG) activity. The SSF was done using a 250 ml Erlenmeyer flask containing 5g of wheat bran and 10 ml of 1% $(NH_4)_2SO_4$ and 0.02% $MgSO_4$ (67% of moisture). 10^6 cells per gram of wheat bran were added to each flask and maintained at 30°C. After 72h, fermented material was mixed with 40 ml distilled water and filtered at vacuum and centrifuged. The supernatant was used to evaluate PG activity.

Assay of polygalacturonase (PG) activity: PG activity was determined by measuring the release of reducing groups using the dinitrosalicylic acid reagent DNS assay (18). The reaction mixture containing 0.8 ml of 1% citric pectin with 67% of metoxilation in 0.2M citrate-phosphate, pH 6.0 buffer and 0.2 ml of culture supernatant, was incubated at 40°C for 10 min. One unit of enzymatic activity (U) was defined as 1 µmol of galacturonic acid released per minute.

RESULTS

1- Selection of strains with pectinolytic activity:

168 bacterial strains able to grow on medium containing citrus pectin as the only carbon source were isolated. These strains were tested for pectin hydrolysis by plate assay, at pH 6.0. The strains were classified as very good producers of pectin depolymerizing enzymes when presented clear halos around colonies of at least 1.5 cm (14), good producers when the halos were of at least 1 cm (36), weak producers when halos were at least 0.5 cm (52) and poor producers when no pectinolytic activity and no clear lysis zones were observed (66).

2- Production of poligalacturonase from *Bacillus* sp isolated on liquid and semi-solid medium

Five *Bacillus* sp demonstrated high pectinolytic activity when assayed by the plate method. These strains were cultivated for polygalacturonase production using SSF and SmF. The data obtained are presented in Table 1.

Table 1. Production of polygalacturonase (U / ml) by *Bacillus* sp in solid-state (SSF) and submerged (SmF) fermentation

Microorganism	SSF	SmF
Bacillus sp Ar1.2	0.8	3.5
Bacillus sp B1.3	0.4	3.0
Bacillus sp M2.1	0.7	4.0
Bacillus sp P4.3	0.3	4.0
Bacillus sp P6.1	0.4	2.7

Extracts from SSF cultures showed higher pectionolytic activities than those obtained by SmF. Maximal polygalacturonase activity was obtained for strains M2.1 and P4.3.

Physico-chemical characteristics of PG

The effect of pH on the activity of PG produced by the *Bacillus* sp strains in SSF was determined by using reaction mixtures at pH values ranging between 3.0 and 10.0 (Fig.1). Pectinolytic activity was the highest at pH 6.0 for all strains except for *Bacillus* P4.3, which presented optimal pH between 6.5 and 7.0.

Assay for determination of the optimal temperature for PG activity indicated maximal activities at 40-50°C for AR1.2, B1.3 and P4.3 strains and 50-55°C for M2.1 and P6.1 strains (Fig 2). PG from AR1.2 showed the largest spectrum of activity as a function of temperature.

To determine the effect of temperature on the stability of PG, enzyme solutions were incubated for 60 min at temperatures between 10°C and 70°C and the residual activity was assayed after cooling. Practically no changes in pectinolytic activities were observed when the incubation temperature was lower than 50°C. The PG of P4.3 was stable for 1h at 60°C (Fig. 3), and the results indicated that the PG activity was similar to the previously obtained values.

Results of the incubation of enzyme solutions at pH values between 3.0 and 10.0 for up to 24 h at 25°C indicated that these PG were stable in the pH range 6-8. PG P4.3 was stable between pH 7 and 9 (Fig. 4).

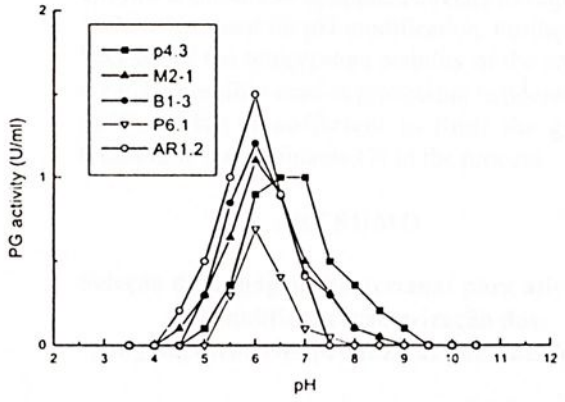


Figure 1: Effect of pH on the polygalacturonase activity produced by *Bacillus* sp on wheat bran. The buffers used were sodium acetate (pH 3.5-5.5), citrate-phosphate (pH 5.5-7.0), tris-HCl (pH 7.0-8.5) and Gly-NaOH (pH 8.5-10.5).

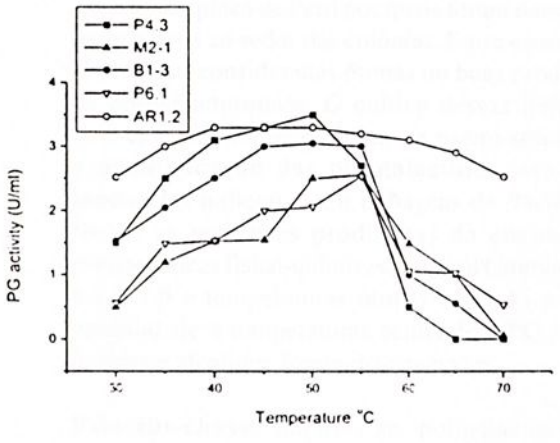


Figure 2: Effect of temperature on the polygalacturonase activity produced by *Bacillus* sp on wheat bran.

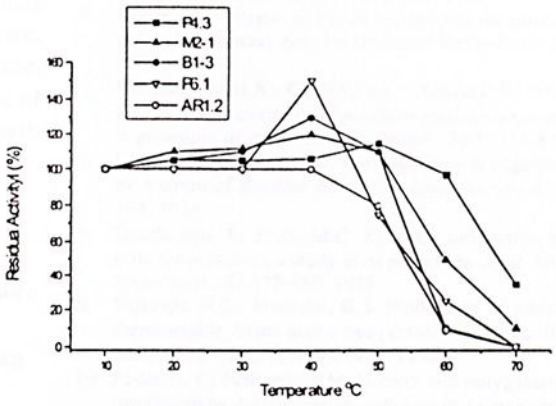


Figure 3: Stability of PG against temperature. The enzymatic solutions were maintained in the temperature range of 10 to 70°C, for 1h. 110% of activity (U/ml): P4.3=3.5; M2.1=2.5; B1.3=3.2; P6.1= 2.3; Ar1.2=3.3

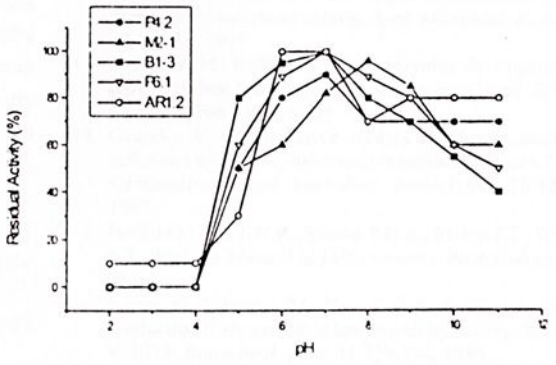


Figura 4: Stability of the PG against pH. The enzymatic solutions were dispersed on 0.1M buffers solutions at various pH values and maintained at 25°C for 24 h. An aliquot was assayed for the residual activity as described in the text. 110% of activity (U/ml): P4.3=3.5; M2.1=2.5; B1.3=3.2; P6.1= 2.3; Ar1.2=3.3

DISCUSSION

Production of pectinases in solid medium was higher than that produced in liquid medium. These results are similar to those obtained with endoglucanases and β- glucosidades (14), xylanases (8), α-amilases (17) and pectinases produced by *A. niger* (1, 25).

Activities of PG produced by *Bacillus* sp strains were higher than those produced by *Aspergillus niger* (19), *Aspergillus sp* and *A. niger* ATCC20107 (16), *Aureobasidium pullulans* (10) and *Tubercularia vulgaris* (12). However, they were lower than those reported using *Bacillus* GK-8 (9).

The pectinolytic activity of the crude solution has specific properties which may offer advantages over currently available pectinase preparations. The enzyme solution can be applied directly to vegetables without the need for pH modification. Furthermore, because of the temperature stability of the enzyme, it can be possibly used at processing temperature of 50°C, which is sufficient to limit the growth mesophilic contaminants (7) in the process.

RESUMO

Seleção de linhagens bacterianas para atividade pectinolítica: caracterização das poligalacturonases produzidas por *Bacillus* sp

A partir de amostras de solo e de material vegetal em decomposição, foram isoladas 168 linhagens bacterianas capazes de utilizar pectina de citrus como única fonte de carbono. Destas, 102 foram positivas para a despolimerização da pectina, através de ensaios em placa de Petri nos quais foram detectados halos claros ao redor das colônias. Entre essas, 30% (50) foram consideradas ótimas ou boas produtoras de poligalacturonase. O cultivo dessas linhagens através de fermentação submersa e semi-sólida para a quantificação das poligalacturonases (PG) produzidas indicou que 6 linhagens de *Bacillus* sp foram as melhores produtoras da enzima. As características físico-químicas, como pH ótimos entre 6,0 e 7,0 e temperaturas ótimas entre 45 e 55°C, estabilidade à temperaturas acima de 40°C e a pH neutros e alcalinos foram determinadas.

Palavras-chave: *Bacillus* sp, poligalacturonase, atividade pectinolítica

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to FAPESP for financial support.

REFERENCES

1. Acunã-Arguelles, M.E.; Gutiérrez-Rojas, M.; Viniegra-González, G.; Favela-Torres, E. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43:808-814, 1995.
2. Alaña, A.; Gabilondo, A.; Hernando, F.; Moragues, M.D.; Dominguez, J.b.; Llama, M.J.; Serra, J.L. Pectin Lyase production by a *Penicillium italicum* strain. *Appl. Environm. Microbiol.* 55: 1612-1616, 1989.
3. Albersheim, P. Pectin lyase from fungi. *Meth. Enzymol.*, 8: 628-631, 1966.
4. Bacarat, M.C.; Valentin, C.; Muchovej, J.; Silva, D.O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. *Biotechnol. Lett.*, 11: 899-902, 1989.
5. Bailey, M.J.; Pessa, E. Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 12: 266-271, 1990.
6. Brumano, M.H.N.; Coelho,J.L.C.; Araújo,E.F.; Silva, D.O. Pectin lyase activity of *Penicillium griseoroseum* related to degumming of ramie. *Rev. Microbiol.*, 24:3: 175-8,1993.
7. Chesson, A.; Codner, R.C. The maceration of vegetable tissue by a strain of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.*, 44:347-364, 1978.
8. Deschamps, F.; Huet, M.C. Xylanase production in solid-state fermentation: a study of its properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22:177-180, 1985.
9. Dosanjh, N.S.; Hoondal, G.S. Production of constitutive, thermostable, hyper active exo-pectinase from Bacillus GK. *Biotechnol. Lett.*, 12:1453-1438, 1996.
10. Federici, F.; Petruccioli, M. Growth and polygalacturonase production by *Aureobasidium pullulans* on orange peel waste. *Microb. Alim. Nutri.* 3: 39-46, 1885.
11. Fernandes-Salomão, T. M.; Amorim, A.C.R.; Chaves-Alves, V. M.; Coelho, J.L.C.; Silva, D.O.; Araújo, E.F. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. *Rev. Microbiol.* 27: 15-18, 1996.
12. Fonseca, M.J.V.; Said, S. The pectinase produced by *Tubercularia vulgaris* in submerged culture using pectin or orange-pulp pellets as indutor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 32-35, 1995
13. Fogart, W.M.; Kelly, C.T. Pectic enzymes. *In*: Fogarty, W.M. (ed) Microbial Enzymes and Biotechnology, *Appl. Sci. Publ.*, London, 1983, p.131-181.
14. Grajek, W. Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26:126-129, 1987.
15. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T.; Williams, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1994, 787p.
16. Larios, G.; Garcia, J. M.; Huiton, C. Endopolygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus sp* CH-Y-1043. *Biotechnol. Lett.*, 11:729-734, 1989.
17. Lonsane, B.K.; Ramesh, M.V. Productionof bacterial termoestable enzymes by solid state fermentation: a potential tool for achieving economy in enzyme production. *Adv. Appl Microbiol.*, 15:1-48, 1992.

18. Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 31: 426-428, 1959.
19. Pereira, Ss; Torres, E.F.; Gonzalez, G.V.; Rojas, M.G.. Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 39: 36-41, 1993.
20. Priest, F. G. Extracellular Enzymes. *In*: Cole. J.A.; Knowles. C.J; Schlessinger,D. *Aspects of Microbiology*, Washington, *American Soc. Microbol.*, 1984, 17p.
21. Ros, J.M.; Saura, D.; Salmerón, M.C.; Lacencina, J. Production of pectic enzymes from *Rhizopus nigricans* cultures with different sources of carbon. *Ann. Microbiol. Enzimol.*,43: 71-76, 1993.
22. Silley, P. The production and properties of a crude pectin lyase from *Lachnospira multiparus*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2: 29-31, 1986.
23. Sreekantian, K. R., Jaleel, S.A.; Rao, T.N.R. Utilization of fungal enzyme in solft fruit and extraction and clarification of fruit fuice. *J. Food Sc. Technol.*, 8: 201-203, 1971.
24. Stressler, K.D.; Joslyn, M.A. *Fruits and vegetable Processing Tecnology*, West-Port, AVI Publishing Co. Inc. 2ª rf, 1971.
25. Trejo-Hernandez, M.R.; Oriol,E.; Lopez-Canales, A.; Roussos, S.; Viniegra, G.; Raimbault, M. Production of pectinases by *Aspergillus niger* by solid state fermentation on support. *Micol. Neotrop. Apl.*, 4: 49-62, 1991.
26. Ueda, S.; Yusaku, F.; Lim, J.Y. Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A-3. *J. Appl. Biochem.*, 4: 524-532, 1982.

World Journal of Microbiology & Biotechnology 17: 79–82, 2001.
© 2001 *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.*

Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction

M.M.C.N. Soares, R. Da Silva, E.C. Carmona and E. Gomes*
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José do Rio Preto, R. Cristóvão Colombo, 2265, Jd Nazareth SP/Br. CEP: 15054-000
**Author for correspondence: E-mail: elenita.bio.ibilce.unesp.br*

Received 11 January 2000, accepted 3 January 2001

Keywords: Juice extraction, pectinases, pectin lyases, polygalacturonases

Summary

Five *Bacillus* strains isolated from decaying vegetable material were cultivated on wheat bran and endo-polygalacturonases, exo-polygalacturonase and pectin lyase activities in the crude enzymatic solution obtained were determined. Highest activity was observed for all enzymes when fermentation was carried out at 28 °C, the highest activity values were obtained after 120 h of cultivation for exo-PG and after 48 h for endo-PG and PL. The use of the enzymatic solution for treatment of fruits and vegetable mash afforded a high juice extraction and a pulp with good pressing characteristics.

Introduction

Pectic enzymes are produced by many groups and species of microorganisms. These enzymes act on the pectic substances that occur as structural polysaccharides in the middle lamella and primary cell walls of higher plants (Fogarty & Ward 1972).

Enzymes which degrade pectin are classified according to their mode of attack on the galacturonan part of the pectin molecule. They can be distinguished between pectin methylesterases (PE, EC 3.1.11.1), which de-esterify pectins to low methoxyl pectins or pectic acid, and pectin depolymerases, which split the glycosidic linkages between galacturonosyl (methyl ester) residues. Polygalacturonases (PGs) split glycosidic linkages next to free carboxyl groups by hydrolysis, while pectate lyases (PALs) split glycosidic linkages next to free carboxyl groups by β-elimination. Both endo types of PGs and PALs (EC 3.2.1.15 and EC 4.2.2.2) are known to split the pectin chain randomly. Exo-PGs (EC 3.2.1.67) release monomers or dimers from the non-reducing end of the chain, whereas exo-PALs (EC 4.2.2.9) release unsaturated dimers from the reducing end. Highly esterified pectins are degraded by endo-pectin lyases (PL; EC 4.2.2.10) and also by a combination of PE with PG or PAL (Pilnik & Voragen 1993).

Pectic enzymes are used industrially in fruit processing to facilitate pressing and to aid separation of the flocculant precipitate by sedimentation, filtration or centrifugation in the extraction of the clarified juice (Lozano *et al.* 1988). Pectic enzymes have also been used in other processes where the elimination of pectin is essential: in wine industries, coffee- and tea-processing plants and maceration of vegetable tissue. These processes usually employ crude enzyme preparations containing more than one pectic enzyme and it has been shown that combinations of other depolymerizing enzymes such as cellulases and hemicellulases can be used successfully (Rombouts & Pilnik 1978; Boccas *et al.* 1994; Da Silva *et al.* 1997).

In this communication, the production of pectinases by five species of *Bacillus* is reported. The action of these pectinases in juice extraction has been determined.

Materials and Methods

Microorganisms

The microorganisms were isolated from decaying vegetables as described in a previous work (Soares *et al.* 1999). Five-gram samples of soil, from agricultural and vegetable waste were pooled and homogenized in sterile medium at pH 6.0 in a solution containing 1% citrus pectin (67% methoxylation); 0.14% $(NH_4)_2SO_4$; 0.20% K_2HPO_4; 0.02% $MgSO_4\ 7H_2O$; 0.10% nutrient solution (5 mg/l $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 1.6 mg l $MnSO_4 \cdot H_2O$; 1.4 mg l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 2.0 mg/l $CoCl_2$). A loop of the homogenate was then streaked onto nutrient medium and incubated at 30 °C for 24 to 72 h. All morphologically contrasting colonies were purified by repeated streaking. Pure cultures were sub-cultured onto slants and maintained for identification and enzymic studies. Among the isolates, five strains were identified as belonging to the

Bacillus genus, based on morphological and biochemical characteristics. The cells were rod-shaped, gram-positive, with endospores oval or round, and catalase-positives. These *Bacillus* spp. demonstrated the highest pectinolytic activity and these strains were cultivated for enzyme production using SSF.

Production of pectic enzyme by solid-state fermentation

SSF was carried out using a 250 ml Erlenmeyer flask containing 5 g wheat bran and 10 ml 1% $(NH_4)_2SO_4$, 0.02% $MgSO_4$ solution (67% moisture content). To each flask 10^6 cells were added per gram wheat bran, and the fermentation was carried out at 28, 30, 35 or 40 °C. After 24 to 120 h, the fermented material was mixed with 40 ml distilled water, filtered by vacuum and centrifuged. The supernatant was used to evaluate enzyme activity.

Enzyme assays

The enzyme activities were determined in mixtures containing crude enzyme solutions and different substrates. Exo-polygalacturonase activity was determined by measuring the release of reducing groups from citrus pectin using the dinitrosalicylic acid reagent (DNS) assay (Miller 1959). The reaction mixture containing 0.8 ml 1% citrus pectin (67% methoxylation) in 0.2 M citrate-phosphate buffer, pH 6.0 and 0.2 ml of culture supernatant, was incubated at 40 °C for 10 min. One unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme which releases 1 μmol galacturonic acid min^{-1}.

Endo-PG action was assayed by determining the percentage decrease in apparent viscosity of a mixture of 12 ml of enzyme and 12 ml of 3% pectin solution in 0.2 M citrate-phosphate buffer, pH 6.5 at 40 °C, using a Fenske-Ostwald viscosimeter as described by Fellows & Worgan (1984). The results were subtracted from experimental controls when denatured enzyme was used, according to the following formula: Apparent viscosity reduction(%) = $(V_c - V_r) \times (V_c - V_s)^{-1} \times 100$ where: V_c = flow time of control, V_r = flow time of sample; V_s = flow time of water. One unit of endo-PG activity was defined as the amount of enzyme which reduced the initial viscosity of pectin solution by 50% in 10 min.

Pectin lyase activity was determined by measuring the increase in absorbance at 235 nm of substrate solution (0.8 ml 1% citric pectin in 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 8.5) hydrolysed by 0.2 ml enzyme solution, at 55 °C. One unit of enzymatic activity (U) was defined as the production of 1 μmol of unsaturated uronide ml^{-1} min^{-1} based on the molar extinction coefficient (5500) of the unsaturated products (Albersheim 1966).

Pectin methylesterase activity was determined by measuring the methanol released by the colorimetric method of Wood & Siddqui (1971).

The activity of xylanase, cellulase (avicelase and carboxymethylcellulase: CMCase) and amylase were determined by measuring the release of reducing sugars (DNS methods) from a 0.9 ml solution containing 1% of specific substrate (birchwood xylan, Avicel, carboxymethycellulose or soluble starch), at 55 °C, on acetate buffer pH 5.0, according Tavares *et al.* (1997). One unit of xylanase, avicelase, CMCase or amylase activity was defined as the amount of enzyme which released 1 μmol of reducing sugar (xylose or glucose) min^{-1}, calculated by reference to a standard curve.

Juice extraction

Fruits (pear, guava, banana and papaya) and vegetables (carrots and beet) were obtained from a local market. After peeling, they were cut and milled or macerated. Ten grams of material were incubated with 1 ml of crude enzymatic extract for 1 h in a reciprocating shaking water bath with a shaking rate of 100 strokes/min and amplitude of 3 cm, at 40 °C. Later the samples were incubated in a boiling water bath for 5 min to inactivate the enzyme. After cooling to room temperature, the juice was filtered by vacuum through filter paper and the volume of juice obtained was measured. Mash-treated inactivated enzyme was used as a control. Mash residues were dried at 105 °C until constant weight and the dry weight determined. The reduction in dry weight of the treated mash was expressed as percentage relative to the control sample.

Results and Discussion

Table 1 presents the endo-polygalacturonase, exo-polygalacturonase and pectin lyase activities in extracts obtained by suspension and filtration of wheat bran fermented by *Bacillus* strains at different temperatures. Pectin methylesterase activity was not detected in the culture media of the five *Bacillus* strains. All enzyme production was influenced by cultivation temperature, with the highest activities being observed at 28 °C in the majority of the enzymes from the five *Bacillus* strains. The highest activity value for exo-PG was 40 U g^{-1} of substrate used in the culture of *Bacillus* sp. Ega 22, after 120 h.

Endo-PG activity in the fermentation medium was maximal (13 to 15.5 U g) after 24–48 h at 28 °C, in the majority of the strains. An increase of temperature did not have a significant effect on endo-PG production. These enzymatic solutions resulted in maximal reduction of the solution of citrus pectin viscosity, between 80 and 97%. The most temperature sensitive strain was *Bacillus* sp. Ar1.2 where the production of endo-PG was reduced by 25% at 30 °C.

PL production by strains was drastically reduced by an increase of temperature (reduction of around 60% at 30 °C). At 28 °C PL activity was found in two peaks, one between 24 and 48 h of fermentation and another, which presented highest activity, after 96 h with maximal production of 900 and 1000 U g^{-1}, respectively. At

Table 1. Petinolytic enzyme production on wheat bran by *Bacillus* strains.

Temperature of cultivation (°C)	Activity (Units per g substrate used in culture)					
	Enzyme	*Bacillus* Ar1.2	*Bacillus* M2.1	*Bacillus* Ega22	*Bacillus* Ega16	*Bacillus* B1.3
28	Exo-PG	20[a]	28[a]	40[d]	35[d]	25[a]
	Endo-PG	12[b]	13[c]	14[b]	15[b]	9[c]
	PL	450[a]	600[a]	550[a]	1000[d]	900[a]
30	Exo-PG	23[a]	37[a]	20[a]	28[a]	23[b]
	Endo-PG	10[b]	12[a]	13[a]	13[a]	9[a]
	PL	350[c]	350[c]	250[a]	500[a]	250[a]
35	Exo-PG	23[a]	30[c]	23[c]	20[a]	17[c]
	Endo-PG	10[a]	12[a]	11[a]	14[a]	10[a]
	PL	300[a]	350[a]	100[a]	450[a]	250[c]
40	Exo-PG	22[a]	20[c]	10[a]	10[c]	15[a]
	Endo-PG	9[a]	12[a]	11[a]	13[a]	9[a]
	PL	200[c]	350[a]	100[a]	400[a]	250[c]

[a] 24 h, [b] 48 h, [c] 72 h, [d] 120 h of fermentation.

temperatures above 30 °C only one PL activity peak was observed.

In this study, at 28 °C, the presence of endo-PG and the first peak of PL was detected simultaneously after 24 h of fermentation, while exo-PG and the second PL peak were observed only after 96 h. The inducers of pectolytic enzymes have been described as breakdown products of pectic substances by the basal levels of these enzymes (Hugovieux-Cotte-Pattat *et al.* 1996). Probably hydrolysis of oligogalacturonates by endo forms of pectinases released galacturonate, saturated digalacturonate or unsaturated digalacturonate, which are inducers of several pectinases such as exo-PG. However, the inference of biochemical and physiological aspects of enzyme synthesis through solid state fermentation is not straightforward. The sequential production of pectinases has been well described for fungal systems like *Botrytis cinerea*, and indicated that a polygalacturonase was always the first pectic enzyme present in the culture fluid (Leone & Van Den Heuvel 1987). *Penicillium frequentans* secreted one endo and one exo-PG during the first 10 h of incubation and, between 17 and 48 h, another two exo and three endo-PGs (Fonseca & Said 1995). Our results demonstrated that a similar pattern seems to occur in bacteria, since multiple pectinases were reported during the time course of fermentation. Studies of Dosanjh & Hoondal (1996) demonstrated production of different polygalacturonases during the growth period of *Bacillus* GK8. Similarly, variable forms of pectin lyase have been reported to be secreted during the course of growth of *Erwinia* species and *Bacillus polymyxa* (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.* 1996; Dosanjh & Hoondal 1996).

It should be mentioned that the SSF system is preferred for pectinase production for a number of reasons (Hesseltine 1977; Ghildjal *et al.* 1981; Castilho *et al.* 1999; Castilho *et al.* 2000). Production of pectinases by semi-solid fermentation (SSF) of wheat bran has been studied with good results by Ghildyal *et al.* (1981) and Soares *et al.* (1999) since these agricultural residues contain appreciable quantities of pectin in addition to cellulose, hemicellulose and starch. This wheat bran composition would explain the presence of depolymerizing enzymes besides pectinases, such as xylanases, cellulases and amylases in the fermentation media.

Fruit and vegetable juice extraction

The crude enzyme solution used for treatment of fruits and vegetables was obtained from wheat bran fermented by five *Bacillus* strains for 96 h and was composed of: xylanase (2.0 to 3.0 U/ml), CMCases (0.5 up to 0.9 U/ml), Avicelase (0.5 up to 0.91), amylase (3.0 up to 3.8 U/ml), Exo-PG (2.5 up to 4.0 U/ml), Endo-PG (1.2–2.0 U/ml) and pectin lyase (200 up to 1000 U/ml).

The yield obtained was improved significantly by enzyme treatment and the material was pressed more easily than the control and the residual dry weight of solid residues decreased 5 to 64%. The yield obtained from milling carrots treated with enzyme solution from *Bacillus* Ar1, 2, Ega16 and Ega22 strains were 40 up to 50 ml juice per 100 g of material, i.e., two-fold higher than the control (20 ml/100 g). Enzyme treatment of crushing and macerating papaya, banana and pear afforded a volume between 60 to 95 ml of juice per 100 g of material, which corresponds to a three-to-four fold increase compared to the control.

Banana and papaya are soft fruits with a high level of soluble pectin (Pilnik & Voragen 1993) and after maceration resulted in a semigelled mass which was very difficult to press. Enzyme application afforded a pulp with better pressing characteristics and a higher juice yield. The juices obtained by enzymatic treatment had lower viscosity compared to those non-treated (data not shown), possibly due to reduction of pectin content. Practically all material was liquefied when enzymatic extracts from *Bacillus* Ega 16 and Ega 22 were used. The difference among yields obtained with the fruits tested could be due to the pH value of the mash, the ripening state but mainly to pectic substances present and their level of esterification.

The enzymes were found to be effective for carrot and beet juice extraction. In this case, the presence of other cell degrading enzymes in the crude enzyme solution, such as cellulases and xylanases would be important. Commercial enzyme preparations used in juice processing are known to contain higher levels of pectinolytic, cellulolytic and xylanolytic activities (Rambouts & Pilnik 1978; Hang & Woodans 1997).

The industrial potential for pectic enzyme preparations derived from these *Bacillus* strains is difficult to evaluate, since other studies are necessary regarding productivity and toxin production. However, such preparations showed the presence of multiple enzymes, a very important characteristic in commercial preparation and could be applied directly to chopped vegetables and fruits at neutral pH without pH modification, presenting high liquefaction capacities. On the other hand, previous studies with crude enzyme solutions (Soares *et al.* 1999) demonstrated optimum temperature, as well as stability of the polygalacturonases at higher temperatures. This information can be very helpful to the industrial user.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

Albersheim, P. 1966 Pectin lyase from fungi. *Methods in Enzymology* **8**, 628–631.

Boccas, F., Roussos, S., Gutierrez, M., Serrano, L. & Viniegra, G.G. 1994 Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. *Journal of Food Science and Technology* **31**, 22–26.

Castilho, L.R., Alves, T.L.M. & Medronho, R.A. 1999 Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* **34**, 181–186.

Castilho, L.R., Medronho, R.A. & Alves, T.L.M. 2000 Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* **71**, 45–50.

Da Silva, R., Franco, C.M.L. & Gomes, E. 1997 Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aPLicação no processamento de alimentos: Revisão. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos* **31**, 249–260.

Dosanjh, N.S. & Hoondal, G.S. 1996 Production of constitutive, thermostable, hyperative exo-pectinase from *Bacillus* GK-8. *Biotechnology Letters* **18**, 1435–1438.

Fellows, P.J. & Worgan, J.T. 1984 An investigation into the pectolytic activity of the yeast *Saccharomycopsis fibuliger*. *Enzyme and Microbial Technology* **6**, 405–410.

Fogarty, W.M. & Ward, O.P. 1972 Pectic substances and pectinolytic enzymes. *Process Biochemistry* **8**, 13–17.

Fonseca, M.J.V. & Said, S. 1995 Sequencial production of pectinases by *Penicillium frequentans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **11**, 174–177.

Ghildyal, N.P., Ramakrishna, S.V., Nirmala, D., Lonsane, B.K. & Astiana, H.N. 1981 Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. *Journal of Food Science and Technology* **19**, 248–251.

Hang, Y.D. & Woodams, E.E. 1997 Xylanolytic activity of commercial juice-processing enzyme preparations. *Letters in Applied Microbiology* **24**, 389–392.

Hesseltine, C.W. 1977 Solid state fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* **14**, 517–532.

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nassar, W. & Reverchon, S. 1996 Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual Review of Microbiology* **50**, 213–257.

Leone, G. & Vanden-Heuvel, J. 1987 Regulation by carbohydrates of the sequential in vitro production of pectic enzymes by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Botany* **65**, 2133–2141.

Lozano, P., Manjón, F., Romojaro, F. & Iborra, J. 1988 Properties of pectolytic enzymes covalently bound to nylon for Apricot juice clarification. *Process Biochemistry* **23**, 75–78.

Miller, G.L. 1959 Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* **31**, 426–428.

Pilnik, W. & Voragen, A.G.J. 1993 Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufature. In *Enzymes in Food Processing*, eds. Nagodawithama, T. & Reed, G. pp. 363–399. New York: Academic Press. ISBN 0-12-513630-7.

Rombouts, F.M. & Pilnik, W. 1978 Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Process Biochemistry* **18**, 9–13.

Soares, M.M.C.N., Da Silva, R. & Gomes, E. 1999 Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia* **30**, 225–230.

Tavares, V.B., Gomes, E. & Da Silva, R. 1997 Characterization of a cellulase-free xylanase producing *Bacillus* sp. for biobleaching of kraft pulp. *Revista de Microbiologia* **28**, 80–85.

Wood, P.J. & Siddiqui, I.R. 1971 Determination of methanol and its application to the measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. *Analytical Biochemistry* **39**, 418–428.

Folia Microbiol. 49 (1), 46–52 (2004) http://www.biomed.cas.cz/mbu/folia/

Screening for Pectinolytic Activity of Wood-Rotting Basidiomycetes and Characterization of the Enzymes

S. XAVIER-SANTOS[a], C.C. CARVALHO[a], M. BONFÁ[a], R. SILVA[a], M. CAPELARI[b], E. GOMES[a]*

[a]*Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto 15054-000, São Paulo, Brazil*

e-mail solxav@yahoo.com.br

[b]*Seção de Micologia e Liquenologia, Instituto de Botânica, São Paulo 01061-970, Brazil*

Received 16 December 2002
Revised version 12 July 2003

ABSTRACT. Seventy-five fungal strains from different groups of basidiomycetes, newly isolated from rotten wood, were screened for pectinolytic activity. Despite the fact that basidiomycetes are scarcely referred to as pectinase producers, the polygalacturonase (PG) activity was detected in 76 % of the strains; 16 % with activity higher than 40 nkat/g, 40 % between 13.3 and 40 nkat/g, and 44 % with activity lower than 13.3 nkat/g. The highest productions were obtained among the fungi from order *Aphyllophorales*, family *Polyporaceae*. The characterization of the enzymes from the highest PG producers (*Lentinus* sp., *Gloeophyllum striatum*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune*) showed optimum temperature for catalytic activity at 60–70 °C and two peaks of pH optimum (3.5–4.5 and 8.5–9.5). The enzymes exhibited high pH stability (3.0–11.0) but after incubation at 40 °C for 1 h their activity dropped by 18–73 %.

Pectin is the main substance that promotes the adherence of cell walls between adjacent vegetable cells and is present in all the terrestrial plants, specially in fruits and legumes (Forgaty and Ward 1972). Pectic polysaccharides have a backbone of D-galacturonic acid, linearlly linked by 1,4-α-D-glycosidic bonds, and contained also other secondary saccharides, such as the rhamnose, arabinose and galactose (McDougall *et al.* 1996).

Pectinolytic enzymes catalyze the degradation of the pectins *via* depolymerization and de-esterification reactions (Wood and Kellog 1988). These enzymes include polygalacturonases (EC 3.2.1) that cleave the 1,4-α-D-glycosidic bonds between two residues of D-galacturonic acid, pectin lyases (EC 4.2.2) that catalyze the β-elimination reaction between two methylated residues, and de-esterifying enzymes, including pectinesterase (EC 3.1.1.11) that catalyze the demethoxylation of the methylated pectin, producing methanol and pectin (Fogarty and Ward 1972; Fogarty and Kelly 1983; Rombout and Pilnik 1990).

The production of pectinolytic enzymes can be observed in both plants and microorganisms but not in animal cells. In plants, these enzymes are involved in maturation of fruits, being responsible for softening and the increase in the content of soluble sugars. They also facilitate the action of phytopathogenic agents promoting the degradation of host tissues. By degrading dead vegetable biomass they assist in soil fertilization and in nutrient recycling.

The main commercial applications of these enzymes are in fruit and vegetable processing, where they serve for the removal and/or modification of the undesired pectin during extraction and clarification of fruit juice, wine, and cider. Other important applications of theses enzymes are in wood preservation, since they increase the permeability for the treatment with preservatives, and in the textile industry in the preparation of cellulose fibers of flax jute and other plant fibers (Forgaty and Ward 1972). Pectinases represent about 7.5 % of the world market of industrial enzymes corresponding to about 75 million USD (Kashyap 2001).

Mitosporic fungi such as *Aspergillus*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Sclerotium*, *Geotrichum*, *Botrytis* (Bailey 1990; Bailey and Pessa 1990; Rombouts and Pilnik 1990; Channe and Shewal 1995; Teixeira *et al.* 2000; Maldonado *et al.* 2002) are the main pectinase producers; the strains employed in commercial production belong to *Aspergillus* species, mainly *A. niger* (Fogarty and Ward 1972; Bailey and Pessa 1990; Sakai *et al.* 1993). Pectinase production has also been detected in phytopathogenic or saprotrophic *Ascomycetes* (*Neurospora crassa*, *Thermoascus aurantiacus*, *Rhizoctonia* sp.; Marcus *et al.* 1986; Rombouts and Pilnik 1990; Martins *et al.* 2002), yeasts (*Saccharomyces* and *Kluyveromyces*; Rombouts and Pilnik 1990), and *Zygomycetes* sp., *Mucor* sp. and *Rhizopus* sp. (Rombouts and Pilnik 1990; Kashyap *et al.* 2001; Kolarova and Augustin 2001).

*Corresponding author.

The information about the basidiomycetes producing pectinases is relatively scarce (Levin and Forchiassim 1988; Pericin *et al.* 1992, 1997; Rihani *et al.* 1995; Antov and Pericin 2001; Antov *et al.* 2001). We investigated enzyme profiles of wood-rotting basidiomycetes isolated from the *Estação Ecológica do Noroeste Paulista* (São José do Rio Preto-Mirassol, São Paulo). The main objective of the study was the pectinolytic activity of these fungi during the production of polygalacturonase (PG; EC 3.2.1.15), and partial physical and biochemical characterization of these enzymes.

MATERIALS AND METHODS

Collection and isolation of the fungi. Wood-rotting basidiomycetes were collected monthly over a period of 1 year at the *Estação Ecológica do Noroeste Paulista*, situated between the cities of São José do Rio Preto and Mirassol in the state of São Paulo, Brazil (20°48′36″ S and 49°22′50″ W).

For culture isolation, fragments of the basidiomata were successively washed with sodium hypochlorite (10 %, *W/V*) and with sterile distilled water, and inoculated on a potato dextrose agar (PDA) medium containing chloramphenicol and benomyl (5 mg/L). The incubation was carried out at 27 °C. For the stock culture preparation, blocks (≈100 mm^2) of myceliate culture free of contaminants were transferred to the PDA medium and incubated until extensive mycelial growth was observed.

Samples of the cultures were later preserved in liquid nitrogen and incorporated into the *Culture Collection of the Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista*, Campus of São José do Rio Preto).

Cultivation of fungi and enzyme production. Pure cultures were evaluated with regard to production of polygalacturonase by solid-state fermentation in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 5 g of sterilized (120 °C, 40 min) wheat bran and 10 mL of 1 % $(NH_4)_2SO_4$ with 20 ppm $MgSO_4$ solution. The moisture content of the medium was ≈67 %. Each flask was inoculated with 3 disks (15 mm diameter) of culture myceliate in PDA medium. The flasks were incubated at 27 °C until complete superficial colonization (2–3 weeks).

The solid fermented material, corresponding to one Erlenmeyer flask, was mixed with 40 mL distilled water, stirred for 40 min, filtered under vacuum and centrifuged (20000 *g*, 10 min). The supernatant was used as the crude enzyme solution.

Besides the isolated material, others strains such as the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* (CCB 478 = ATCC 28326) and the mitosporic fungi *Aspergillus niger* (NRRL 3122), *Penicilium italicum* (IZ 1584), *P. viridicatum* (RFC 3) and *P. glabrum* (= *P. frequentans*) (CCT 2037) that were previously considered to be good producers of pectinases (Said *et al.* 1991; Berovic and Logar-Derencin 1993; Acuña-Arguelles *et al.* 1995; Hennies 1996; Silva *et al.* 2003) were evaluated and used as reference cultures. The enzyme production by mitosporic fungi was estimated after a 40-h cultivation.

Enzyme activity measurements. PG activity was determined in a mixture containing 0.8 mL 1 % citric pectin, 67 % methoxylated (*Braspectina*), in 0.25 mol/L acetate buffer (pH 4.5) and 0.2 mL of crude enzyme solution. The mixture was incubated at 40 °C for 10 min; released reducing sugars were measured according to Somogyi (1952). Enzyme activity was expressed in nkat (the amount of enzyme that releases 1 nmol of D-galacturonic acid per s); enzyme production is given in nkat/g initial dry solid substrate.

Enzyme characterization. Five crude-enzyme solutions that presented the highest PG activity were characterized with regard to the temperature and pH optimum, and thermal and pH stability. The reactions were done as described *above*; the reducing sugar was measured using the 2,4-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent assay (Miller 1959). Optimum pH for enzyme activity was determined at 55 °C using sodium acetate (pH 3.5–5.5), citrate–phosphate (pH 5.5–7.5), Tris-HCl (pH 7.0–8.5) and glycine–NaOH (pH 8.5–10.5) buffers. The optimum temperature was assayed by incubation at 35–65 °C. Thermostability. Enzyme solution was incubated at 17–65 °C for 1 h at pH 4.5. An aliquot was withdrawn and placed on ice before being assayed for residual pectinase activity at optimum pH and temperature. pH stability. Crude enzyme was dissolved (1 : 1) in McIlvaine buffer (pH 3.5–11.0) and maintained at 25 °C for 1 d. An aliquot was used to determine the remaining activity as *above*.

RESULTS AND DISCUSSION

Production of pectinase by solid-state fermentation. Seventy-five strains were isolated as pure cultures; they were classified as belonging to 7 orders, 17 families and 42 species of basidiomycetes according to the most generally accepted fungal classification (Hawksworth *et al.* 1983) (Table I).

Table 1. Polygalacturonase production (nkat/g) in isolates from different groups of basidiomycetes

Taxonomic position	Isolate	nkat/g
Order *Aphyllophorales*		
Family *Polyporaceae*		
Coriolopsis byrsina (MONT.)RYV.	SXS 10	19.2
	SXS 23	4.66
	SXS 101	13.5
	SXS 112	5.50
	SXS 146	38.6
	SXS 169	6.16
Pycnoporus sanguineus (L.:FR.)MURR.	SXS 43	57.3
	SXS 126	46.7
	SXS 365	54.3
Hexagonia papyraceae BERK.	SXS 62	10.7
	SXS 289	6.50
Hexagonia hydnoides (FR.) M. FIDALGO	SXS 171	1.83
Hexagonia hirta (FR.)FR.	SXS 76	7.83
	SXS 96	16.5
Trametes sp.	SXS 20	27.2
	SXS 357	19.0
Gloeophyllum striatum (SW. ex FR.)MURR.	SXS 40	75.1
	SXS 70	31.8
	SXS 90	–[a]
	SXS 149	–[a]
	SXS 152	–[a]
cf. *Lenzites* sp.	SXS 128	50.3
Polyporus tricholoma MONT.	SXS 322	0.17
Perenniporia medula-panis (JACQ.:FR.)DONK.	SXS 358	12.2
cf. *Diplomitoporus* sp.	SXS 366	–[a]
Family *Corticiaceae*		
Mycobonia flava (BERK.)PAT.	SXS 324	41.2
Peniophora sp.	SXS 04	2.33
	SXS 105	9.33
	SXS 11	12.5
Phlebia sp.	SXS 139	–[a]
cf. *Phanerochaete* sp.	SXS 71	23.0
cf. *Radulodon americanum* RYV.	SXS 05	–[a]
not identified	SXS 64	18.8
	SXS 82	9.83
	SXS 92	4.50
	SXS 313	–[a]
	SXS 388	46.7
Family *Schizophyllaceae*		
Schizophyllum commune FR.:FR.	SXS 38	40.5
	SXS 39	49.3
	SXS 125	0.83
	SXS 170	[a]
	SXS 385	7.00
Family *Hymenochaetaceae*		
Phellinus rimosus (BERK.)PILAT.	SXS 13	[a]
	SXS 47	32.2
Phellinus gilvus (SCHW.)PAT.	SXS 26	8.00
Inonotus rickii (PAT.)REID	SXS 37	30.5
Family Stereaceae		
Stereum hirsutum	SXS 84	4.50
Stereum sp.	SXS 113	25.5
Family *Podoscyphaceae*		
Aquascypha hydrophora (BERK.)REID	SXS 180	[a]
	SXS 276	2.83

Family *Clavariaceae*		
Pterula sp.	SXS 268	16.2
Clavulinopsis helveola	SXS 336	2.83
Family *Lentinaceae*		
Lentinus strigellus Berk.	SXS 355	[a]
Lentinus sp.	SXS 48	82.5
	SXS 51	37.2
	SXS 360	5.00
Order *Auriculariales*		
Family *Auriculariaceae*		
Auricularia fuscosuccinea (Mont.)Farl.	SXS 187	16.2
	SXS 361	[a]
Order *Dacrymycetales*		
Family *Dacrymycetaceae*		
Dacryopinax elegans (Berk. & Curtis)Martin	SXS 323	7.16
Order *Nidulariales*		
Family *Nidulariaceae*		
Cyathus striatus (Huds.)Pers.	SXS 174	[a]
	SXS 209	24.2
Order *Agaricales*		
Family *Tricholomataceae*		
Chaetocalathus liliputianus Sing.	SXS 115	12.0
Crinipellis sp.	SXS 175	[a]
	SXS 216	[a]
Marasmius haematocephalus (Mont.)Fr.	SXS 309	22.5
Marasmius sp.	SXS 202	39.5
	SXS 214	1.50
Gerronema dennisii Sing.	SXS 230	nd
Collybia sp.	SXS 314	20.2
Family *Pluteaceae*		
Pluteus cf. *cubensis* (Murr.)Dennis	SXS 320	[a]
Family *Strophariaceae*		
Psilocybe cf. *subcoprophila* Britz.	SXS 159	16.5
Family Coprinaceae		
Panaeolus sphinctrinus (Fr.)Quél.	SXS176	[a]
Family *Cortinariaceae*		
Gymnopilus zenkeri (P. Henn.)Sing.	SXS 212	13.7
not identified	SXS 173	[a]
Order *Lycoperdales*		
Family *Lycoperdaceae*		
not identified	SXS 379	1.33
Reference strains		
Order *Aphyllophorales*		
Family *Corticiaceae*		
Phanerochaete chrysosporium Burds.	CCB 478 (= ATCC 28326)	48.3
Mitosporic Fungi		
Aspergillus niger Tiegh	NRRL 3122	16.0
Penicillium glabrum (Wehmer)Westling	CCT 2037	27.7
Penicillium italicum Wehmer	IZ 1584	20.8
Penicillium viridicatum Westling	RFC 3	18.8

[a]Not detected.

A total of 55 purified cultures (76 %) presented PG activity and 16 % of them showed production above 40 nkat/g, 40 % between 13.3 and 40.0 nkat/g , and 44 % showed activity less than 13.3 nkat/g. In general, strains with the highest production of the enzyme were found in the order *Aphyllophorales*, family *Polyporaceae*. The amounts of produced enzyme varied depending on the strain, although strains of the same species with different levels of production were encountered, reflecting the existence of intraspecific genetic variability.

Five highest PG productions, *viz.* 82.5, 75.1, 57.3, 54.3 and 49.3 nkat/g (equivalent to 10.3, 9.3, 7.2, 6.8 and 6.2 nkat/mL, respectively), were detected in the strains *Lentinus* sp. (SX S48), *Gloeophyllum striatum* (SXS 40), *Pycnoporus sanguineus* (SXS 43 and SXS 365) and *Schizophyllum commune* (SXS 39), respectively. Some basidiomycetes showed activity equal or higher than the reference strains. However, the comparison of our results with literature data for different microorganisms producing pectinases is rather difficult due to considerable differences in substrates used and to variation of assay procedures.

When screening from 72 strains of the genus *Candida* on different carbon sources for the pectinolytic activity, Call *et al.* (1984) detected in 6 strains an activity in the range of 0.5–14.2 nkat/mL. Soares *et al.* (1999) detected PG activity between 6.7 and 13.3 nkat/mL in solid-state and 45.0–66.6 nkat/mL in submerged fermentation using strains of *Bacillus* spp. isolated from soil samples. Optimizing the production of PG in *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp., Said *et al.* (1991) obtained an activity of 26.7 nkat/mL after a 2-d cultivation. Information about the screening for pectinolytic activity among basidiomycetes is relatively scarce but some studies with collection strains revealed the potential of this group in pectinase production. Antov and Pericin (2001) and Antov *et al.* (2001) detected a production of pectinases (41.6 nkat/mL) by *Polyporus squamosus* in submerged fermentation on a medium with commercial pectin and 11.1 nkat/mL on a medium containing sugar-beet extraction waste as pectin source.

In spite of being extensively studied with respect to its lignin–cellulolytic enzymic system, *Phanerochaete chrysosporium* is not well characterized in respect of pectinolytic enzymes; *e.g.*, Rihani *et al.* (1995) detected pectinolytic activity in *Sporotrichum pulverulentum* (the anamorph phase of *Phanerochaete chrysosporium*). Our strain of *P. chrysosporium* CCB 478 exhibited PG activity (48.3 nkat/g) higher than the reference cultures of mitosporic fungi (Table I).

Enzyme characterization. The physico-chemical characterization of PG showed optimum temperature for activity at 60–70 °C (70 °C for *P. sanguineus* SXS 43, 60–70 °C for *G. striatum* SXS 40 and *P. sanguineus* SXS 365, and 60 °C for *Lentinus* sp. SXS 48 and *S. commune* SXS 39) (Fig. 1A).

PG had the highest activity at acid pH (3.5–4.5), except for the enzyme from *Gloeophyllum striatum* SXS 40 (pH 9.0). However, when the assays were accomplished with crude enzyme extract all the fungi were shown to contain a second peak of activity at alkaline pH (8.5–9.5) (Fig. 1B), suggesting the presence of other enzymes that release reducing sugar from pectin.

Thermal stability of the enzymes varied. The residual activity found after the incubation at 40 °C was 27–82 % (*S. commune* SXS 39 and *P. sanguineus* SXS 43, respectively). *P. sanguineus* SXS 43 exhibited the highest stability to increased temperatures, maintaining residual activity of ca. 75 % even after a 1-h incubation at 60 °C. The residual enzyme activity of other isolates varied at this temperature from 31 to 37 % (Fig. 1C).

The enzymes exhibit a wide stability with respect to pH (3.0–8.5); they maintained a residual activity ≥50 % at most pH values assayed (Fig. 1D). The lowest residual activities were observed after incubation at pH 6 and 11.

It can be of interest to highlight the properties of the isolate *Pycnoporus sanguineus* SXS 43 such as the elevated production and optimum temperature, low-pH optimum and a considerable temperature and pH stability (characteristics that are desirable for industrial application).

The values of enzyme activity detected in characterization assays were generally higher than those in *in vitro* reactions. Since the pectinolytic activity of the samples was initially unknown (until complete elaboration of the *in vitro* assays), Somogyi's procedure (Somogyi 1952) was used due to its greater sensitivity and, therefore, the ability to detect activity even at very low levels. However, for enzyme-characterization assays, when the pectinolytic activity of the fungi was already determined, the DNS method seems to be more suitable. Although the sensitivity of the Somogyi's method is almost ten times higher, for still unknown reasons, the DNS method gives higher values of enzyme activity than the former one (Biely *et al.* 1992).

Our study represents the currently broadest screening for pectinolytic activity in basidiomycetes; the PG activity has been detected for the first time in a number of species from different taxonomic groups, although the levels obtained did not necessarily reflect the optimum production for each strain (the conditions of the screening assay were the same for all the strains). As mentioned by Teixeira *et al.* (2000) and Maldonado and Callieri (1989), variations in production, extraction and activity assays can have considerable effects.

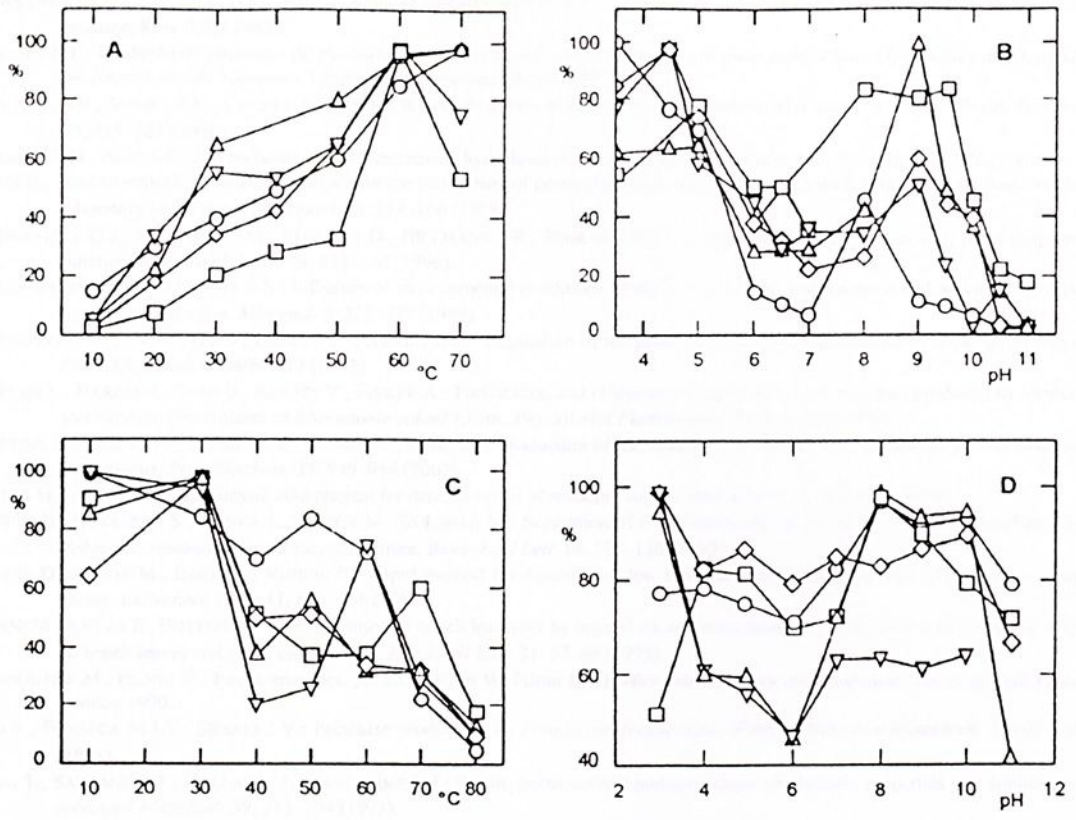


Fig. 1. Characterization of polygalacturonases: effect of temperature and pH on the enzyme activity (**A** and **B**) and enzyme stability (**C** and **D**); *inverted triangles – Schizophyllum commune* SXS 39, *circles – Pycnoporus sanguineus* SXS 43, *diamonds – Pycnoporus sanguineus* SXS 365, *triangles – Gloeophyllum striatum* SXS 40, *squares – Lentinus* sp. SXS 48; buffers: sodium acetate (pH 3.5–5.5), citrate–phosphate (pH 6.0–7.0), Tris-HCl (pH 7.5–8.5), glycine–NaOH (9.0–11.0); the relative activity was determined based on maximum production (in nkat/g): 310 for *Schizophyllum commune* SXS 39, 1166 *Gloeophyllum striatum* SXS 40, 1325 *Pycnoporus sanguineus* SXS 43, 898 *P. sanguineus* SXS365, 636 *Lentinus* sp. SXS 48.

Basidiomycetes include many edible species; they also have mycelial growth and exhibit a good colonization of the substrate, resulting in large amounts of biomass which, besides providing some enzymes, could be used as a protein source in human and animal diet.

The authors thank the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* for financial support and to Dr. R. Krishnaswmy Arni for valuable help during the work.

REFERENCES

ACUÑA-ARGUELLES M.E., GUTIERREZ-ROJAS M., VINIEGRA-GONZALES G., FAVELA-TORRES E.A.D.: Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* **43**, 808–814 (1995).

ANTOV M.G., PERICIN D.M.: Production of pectinase by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system. *Enzyme Microb.Technol* **28**, 467–472 (2001).

ANTOV M.G., PERICIN D.M., DIMIC G.R.: Cultivation of *Polyporus squamosus* for pectinase production in aqueous two-phase system containing sugar beet extraction waste. *J Biotechnol.* **91**, 83–87 (2001).

BAILEY M.: Effect of temperature on polygalacturonase production by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb Technol* **12**, 622–624 (1990).

BAILEY M.J., PESSA E.: Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microb.Technol.* **12**, 268–271 (1990).

BEROVIC M., LOGAR-DERENCIN M.: Solid state fermentation of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *J Chem Technol Biotechnol* **56**, 209–211 (1993).

BIELY P., VRŠANSKA M., KUCHAR S.: Identification and mode of action of endo-(1,4)-β-xylanases, pp. 81–98 in J. Visser, G. Beldman, M.A. Kusters-van Someren, A.G.J. Voragen (Eds): *Xylans and Xylanases*. Elsevier, Amsterdam 1992.

CALL H.P., HARDING M., EMEIS C.C.: Screening for pectinolytic *Candida* yeasts: optimization and characterization of the enzymes *J Food Biochem.* **9**, 193–210 (1985).

CHANNE P.S., SHEWAL J.G.: Pectinase production by *Sclerotium rosfsii*: effect of culture conditions. *Folia Microbiol.* **40**, 111–117 (1995).

FOGARTY W.M., KELLY C.T.: Pectic enzymes, pp. 131–181 in W.M. Fogarty (Ed): *Microbial Enzyme Biotechnology* Applied Science Publishers, London 1983.

FOGARTY W.M., WARD O.P.: Pectic substances and pectinolytic enzymes. *Proc Biochem.* 7, 13–17 (1972).

HAWKSWORTH D.L., SUTTON B.C., AINSWORTH G.C.: *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. Commonwealth Mycological Institute, Kew (UK) 1983.

HENNIES P.T.: Produção de pectinase de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido. *Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos*. UNICAMP, Campinas (Brazil) 1996.

KASHYAP D.R., VOHRA P.K., CHOPRA S., TEWARI R.: Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Biores Technol* **77**, 215–227 (2001).

KOLAROVA N., AUGUSTIN J.: Production of polysaccharide hydrolases in the genus *Rhizopus*. *Folia Microbiol.* **46**, 223–226 (2001).

LEVIN L., FORCHIASSIM F.: Culture conditions for the production of pectinolytic enzymes of the white-rot fungus *Trametes trogii* on the laboratory scale. *Acta Biotechnol.* **18**, 157–166 (1988).

MCDOUGALL G.J., MORRISON I.M., STEWART D., HILLMANN J.R.: Plant cell walls as dietary fibre: range, structure, processing and function. *J Sci Food Acric.* **70**, 133–150 (1996).

MALDONADO M.C., CALLIERI D.A.S.: Influence of environmental conditions on the production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger*. *Mircen J.* **5**, 327–333 (1989).

MALDONADO M.C., CÁCERES S., GALLI E., NAVARRO A.R.: Regulation of the production of polygalacturonase by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.* **47**, 409–412 (2002).

MARCUS L., BARASH I., SNEH B., KOLTIN Y., FINKER A.: Purification and characterization of pectolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani* KUHN. *Physiol.Mol.Plant Pathol.* **29**, 325–336 (1986).

MARTINS E.S., SILVA D., DA SILVA R., GOMES E.: Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Proc.Biochem.* **37**, 949–954 (2002).

MILLER G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal.Chem.* **31**, 426–428 (1959).

PERICIN D., KEVRESAN S., BANKA L., ANTOV M., SKRINJAR M.: Separation of the components of pectinolytic complex produced by *Polyporus squamosus* in submerged culture. *Biotechnol.Lett.* **14**, 127–130 (1992).

PERICIN D., ANTOV M., DIMIC N., VUJICIC B.: Rapid method for detection of low basal activity of exo-pectinase of *Polyporus squamosus*. *Biotechnol.Tech.* **11**, 833–836 (1997).

RIHANI M., KIFFER E., BOTTON B.: Decomposition of beech leaf litter by microflora and mesofauna. I. *In vitro* action of white-rot fungi on beech leaves and foliar components. *Eur.J.Soil Biol.* **31**, 57–66 (1995).

ROMBOUTS F.M., PILNIK W.: Pectic enzymes, pp. 227–282 in W. Pilmir (Ed.): *Microbial Enzymes and Bioconversion*. Academic Press, London 1990.

SAID S., FONSECA M.J.V., SIÉSSERE V.: Pectinase production by *Penicillium frequentans*. *World J.Microbiol.Biotechnol.* **7**, 607–608 (1991).

SAKAI T., SAKAMOTO T., HALLAERT J., VANDAMME E.J.: Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and application. *Adv.Appl.Microbiol.* **39**, 213–294 (1993).

SILVA D., MARTINS E.S., SILVA R., GOMES E.: Pectinase production from *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural residues and agro-industrial by-product. *Brazilian J.Microbiol., in press* (2003).

SOARES M.C.N., SILVA R., GOMES E.: Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Rev.Microbiol.* **30**, 225–230 (1999).

SOMOGYI M.: Notes on sugar determination. *J.Biol.Chem.* **195**, 19–23 (1952).

TEIXEIRA M.F.S., LIMA FILHO J.L.L., DURÁN N.: Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Brazil.J Microbiol.* **31**, 286–290 (2000).

WOOD W.A., KELLOGG S.T. (Eds): *Methods in Enzymology, Vol. 161: Biomass, Part B: Lignin, Pectin, and Chitin*, pp. 315–322. Academic Press, New York 1988.

Folia Microbiol. 46 (4) 303–308 (2001) http://www.biomed.cas.cz/mbu/folia/

Production, Characterization and Properties of Polysaccharide Depolymerizing Enzymes from a Strain of *Curvularia inaequalis*

E. GOMES, T. BEMBO, R. DA SILVA

Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, 15 054-000, Brasil

e-mail: elem@bio.ibilce.unesp.br

Received 2 October 2000
Revised version 19 February 2001

ABSTRACT. Xylanase, β-glucosidase, β-xylosidase, endoglucanase and polygalacturonase production from *Curvularia inaequalis* was carried out by means of solid-state and submerged fermentation using different carbon sources. β-Glucosidase, β-xylosidase, polygalacturonase and xylanase produced by the microorganisms were characterized. β-Glucosidase presented optimum activity at pH 5.5 whereas xylanase, polygalacturonase and β-xylosidase activities were optimal at pH 5.0. Maximal activity of β-glucosidase was determined at 60 °C, β-xylosidase at 70 °C, and polygalacturonase and xylanase at 55 °C. These enzymes were stable at acidic to neutral pH and at 40–45 °C. The crude enzyme solution was studied for the hydrolysis of agricultural residues.

A large number of fungi, isolated from different lignocellulosic materials, have been screened for their ability to degrade polysaccharides present in biomass producing fungal protein or higher value products (Oudot *et al.* 1993; Buswell *et al.* 1996; Sunna and Abtranikian 1997; De-Paula *et al.* 1999; Augustin 2000; Kolarova and Augustin 2001).

The complete degradation of lignocellulosic material requires a group of enzymes including hemicellulases (β-1,4-endoxylanase, EC 3.2.1.8; β-mannosidase, 3.2.1.25; xylan 1,4-β-xylosidase, EC 3.2.1.37; α-arabinosidase, EC 3.2.1.55; acetylesterase, EC 3.1.1.6), cellulases (cellulase, EC 3.2.1.4; glucan 1,4-β-glucosidase, EC 3.2.1.74; cellulose 1,4-β-cellobiosidase, EC 3.2.1.91; β-glucosidase, EC 3.2.1.21) and pectinases (pectinesterase, EC 3.1.1.11; pectin lyase (exo-PL), EC 4.2.2.10; pectate lyase (endo-PL), EC 4.2.2.2; galacturan 1,4-galacturonidase (exo-PG), EC 3.2.1.67; polygalacturonase (endo-PG), EC 3.2.1.15) (Sarkanen 1991; Bigielis 1993; Blanchete 1994; Chahal 1991).

The lignin biodegradation is an oxidative process. The ligninolytic system is formed mainly by three types of extracellular enzymes: lignin peroxidases, Mn-dependent peroxidases and laccases. These enzymes catalyze the one-electron oxidation of lignin units resulting in various non-enzymic reactions which include bond cleavage (Rodriguez Couto *et al.* 2000).

These enzymes have a wide range of applications, mainly in food, animal feed, and the textile, fuel and chemical industries (Da Silva *et al.* 1997). Other areas of application include the paper and pulp industry, waste management, pollution treatment, medical and/or pharmaceutical industry and scientific research (Duran *et al.* 1994; Bhat and Bhat 1997; Tavares *et al.* 1998; Guiraud *et al.* 1999). Major impediments to the exploitation of the commercial depolymerizing enzymes are their yield, stability, specificity and the cost of production. New enzymes for use in commercial applications with desirable biochemical and physico-chemical characteristics and a low cost of production have been the focus of extensive research.

This study addressed the production of polysaccharide depolymerizing enzymes by a *Curvularia inaequalis* strain in submerged and solid-state fermentation and evaluation of the potential of these enzymes the hydrolysis of agricultural residues. Some physico-chemical characteristics of the most active enzymes produced were presented.

MATERIAL AND METHODS

Microorganism. The *Curvularia inaequalis* strain 11.1 was isolated from leaf litter in Caxambu (Minas Gerais, Brasil) and was maintained on potato dextrose agar (PDA) slopes as a stock culture. The identification of species was made by the *Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello"* (Campinas, São Paulo, Brasil).

Cultivation of microorganism and enzyme production. Production of enzymes by solid-state fermentation (SSF) was carried out using a 250 mL Erlenmeyer flask containing 5 g of solid residues (wheat

bran or sawdust) and 10 mL of nutrient solution composed of (in %) $(NH_4)_2SO_4$ 0.3, KH_2PO_4 0.15, CaO 0.05, $MgSO_4$ 0.02, ZnO 0.62, $FeCl_3$ $6H_2O$ 0.27, $CoCl_2$ $6H_2O$ 0.01, $CuSO_4$ $5H_2O$ 0.01, H_3BO_3 0.003 (67 % moisture content). The sterilized medium was inoculated with mycelial fragments (20 mm in diameter per gram of wheat bran) from fully grown fresh plates and maintained at 28 °C. After 1–8 d, the solid fermented material was mixed with 30 mL distilled water, stirred, vacuum filtered and centrifuged. The supernatant was used as crude enzyme solution.

The submerged fermentation (SMF) was carried out using 125 mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL of liquid medium composed of 1 % of carbon source birchwood xylan (*Sigma*), citrus pectin (*Braspectina*) or cellulose (*Merck*), and nutrient solution as described above. The medium was inoculated with mycelial fragments (a quarter of a 20 mm diameter disc per mL of medium) and the cultures were grown in a rotary shaker (2.5 Hz, 30 °C). The biomass produced by SMF was separated by centrifugation (10 000 *g*, 20 min). The cell-free medium was used as a crude enzyme solution.

Enzyme activities were determined using 0.1 mL of sample of cultivation medium and 0.9 mL of specific substrate solution. Xylanase activity was determined using 1 % birchwood xylan in 0.1 mol/L sodium acetate buffer (pH 5.6) at 40 °C. Endoglucanase and cellobiohydrolase activities were determined by the same procedure described for xylanase using carboxymethyl cellulose and crystalline cellulose (both *Merck*) as substrate, respectively. Polygalacturonase activity was determined by means of a solution of 1 % pectin (*Sigma*) in 0.1 mol/L citrate–phosphate buffer (pH 5.0) at 40 °C. The number of reducing groups, expressed as xylose, glucose or galacturonic acid released by enzyme reaction, was quantified by the 3,5-dinitrosalicylic acid method (DNS) (Miller 1959). β-Xylosidase activity was assayed by the liberation of 4-nitrophenol from 4-nitrophenyl β-D-xylopyranoside (*Sigma*) in 0.1 mol/L sodium acetate buffer (pH 5.6). The reaction was stopped with 1 mL of 2 mol/L Na_2CO_3. β-Glucosidase activity was assayed as for β-xylosidase activity but using 4-nitrophenyl β-D-glucoside. One enzyme unit was defined as the amount of enzyme which releases one μmol of reducing sugar (xylose, glucose or galacturonic acid) or 4-nitrophenol per min in assay conditions.

Enzyme characterization. Optimal temperature, pH and thermal and pH stability was determined in a temperature range 10–70 °C, and pH 2.5–10.5.

Hydrolysis experiments. Saccharification experiments were performed with a crude enzyme preparation obtained from wheat bran fermentation by *C. inaequalis*. Five mL of the enzyme solution and 45 mL of a suitable buffer (0.1 mol/L) were incubated with 1 % of agricultural residues (orange bagasse provided by *Citrovita S/A, Catanduva-SP* and corn husks). The mixture was maintained in a rotary shaker (2.5 Hz) at different temperatures for 6–7 d. An aliquot of this mixture was taken at 12-h intervals and boiled for 8 min. Reducing sugars were determined by the DNS method and the hydrolysis products were identified by paper chromatography (Whatman no. 1 filter paper in a descending flow using the following solvents: ethyl acetate–2-propanol–water, 6 : 3 : 1, *V/V*; 15 h). The control consisted of the same treatment using denatured enzymes.

RESULTS

Enzyme production on SMF (in a liquid medium). When xylan was the only carbon source, *C. inaequalis* produced polygalacturonase, xylanase, β-glucosidase and β-xylosidase (Fig. 1). Maximum polygalacturonase production was observed after 5 d (2.4 U/mL), xylanase production after 4 d (1.3 U/mL), while β-glucosidase and β-xylosidase production reached maximum values after 5 d.

When citrus pectin was used as the sole carbon source, the fungus produced the highest quantities of polygalacturonase (4.5 U/mL), xylanase (0.9 U/mL) and β-glucosidase (0.1 U/mL) after 3, 2 and 5 d, respectively (Fig. 1B). β-Xylosidase activity was not observed.

The medium containing cellulose as a carbon source afforded only endo-glucanase and β-glucosidase and the values obtained were low (0.8 and 0.05 U/mL, respectively). No activity of other enzymes was recorded (Fig. 1C).

Enzyme production on SSF. Maximal production of xylanase and polygalacturonase was obtained after 7 and 8 d, respectively. β-Xylosidase and β-glucosidase exhibited maximal activity after 6 d (Fig. 1D). Endo-glucanase activity was observed after 4 d.

When the substrate of SSF was sawdust, only xylanase and β-glucosidase were observed, with maximum activity after 7 d (Fig. 1E).

Crude enzyme characterization. Polygalacturonase, xylanase, β-glucosidase and β-xylosidase activities in the crude enzyme preparation obtained after cultivation on wheat bran were characterized in preliminary experiments.

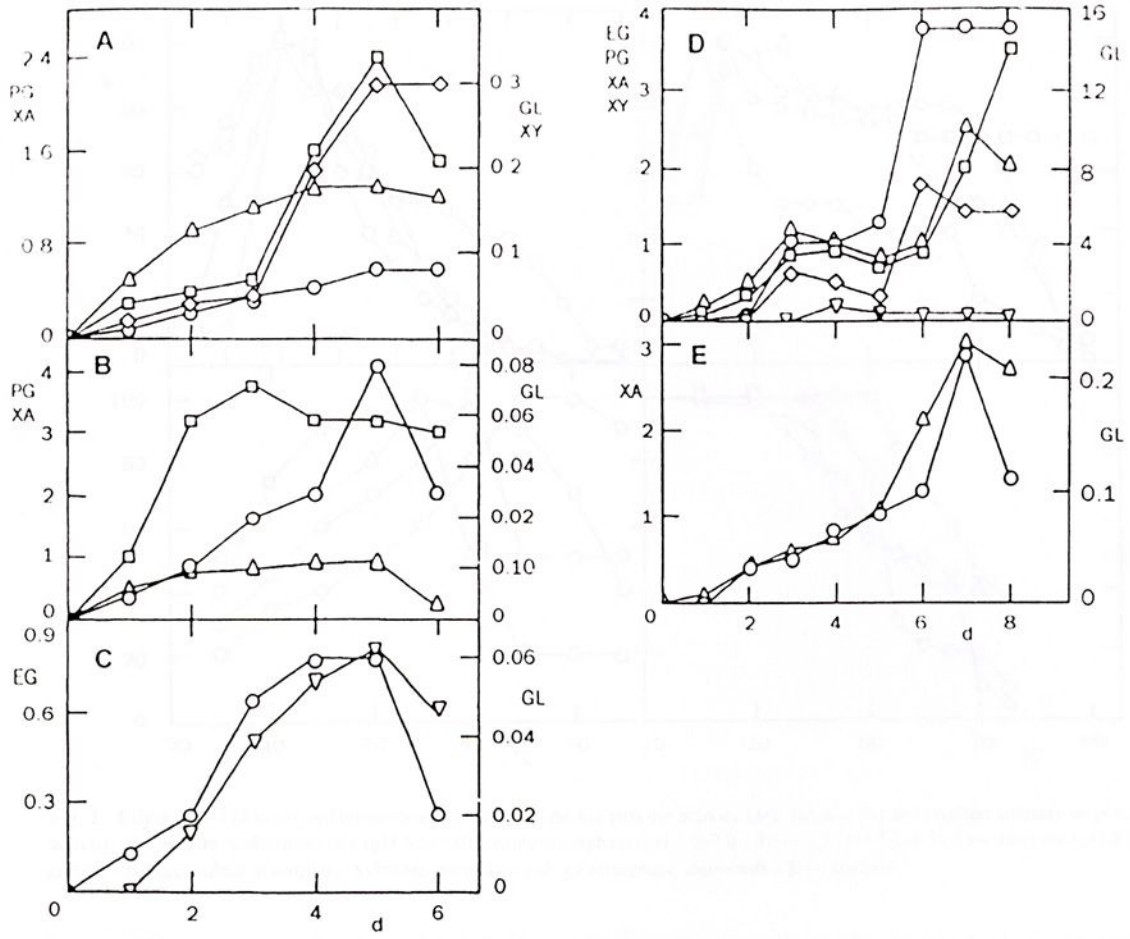


Fig. 1. Production of enzymes (U/mL) on SmF (*left*) using xylan (A), citrus pectin (B) and cellulose (C) and on SSF (*right*) using wheat bran (D) and sawdust (E) as the sole carbon source; *circles* – β-glucosidase (GL), *triangles* – xylanase (XA), *squares* – polygalacturonase (PG), *inverse triangles* – endoglucanase (EG), *diamonds* – β-xylosidase (XY)

All the enzymes exhibited a pH optimum around 5.0 (Fig. 2). The optimum temperature for xylanase and polygalacturonase activity was 55, for β-glucosidase 60 and for β-xylosidase 65 °C. Polygalacturonase, β-glucosidase and β-xylosidase were highly stable at acidic pH (4.0–4.5), xylanase was stable at pH 5.0–5.5. When kept at 45 °C for 1 h, the residual activity of β-glucosidase was 100 %; 80 % of its activity was maintained at 60°C. β-Xylosidase and xylanase retained 90 and 80 % of their activities, respectively, after 1 h at 40 °C; polygalacturonase was 100 % stable at 55 °C, retaining 60 % of its activity at 65 °C.

Hydrolysis experiments. The ability of crude enzymes to hydrolyze some agricultural residues was estimated and the products of the hydrolysis were examined by paper chromatography – crude enzymes were capable of attacking corn husks with glucose and xylose liberation (Table I). Initially (2 and 6 h), large amounts of reducing sugar were liberated (0.78 up to 1.0 g/L) with the maximum concentration after 12 h of enzyme treatment (1.2 g/L). Glucose was detectable at the beginning of the treatment while xylose was detectable only after 4 h, with accumulation in the subsequent periods; xylobiose was not detected. Large amounts of reducing sugar were accumulated during enzyme hydrolysis of orange bagasse (2–6 h; 0.65–1.1 g/L) with a slow increase up to 1½ d (1.7 g/L). The products detected were glucose and xylose in the initial phase of the treatment (4 h), while galacturonic acid could be observed just after 12 h (Table I).

DISCUSSION

In xylan and wheat bran media β-xylosidase was liberated into the medium. Similarly as in many another microorganisms, β-xylosidase remained cell-associated (Myburgh *et al.* 1991; Flores *et al.* 1996; Krištůfek *et al.* 1995). Since cell-associated β-xylosidase activity was not assayed the production potential for this enzyme in other substrates studied could not be evaluated.

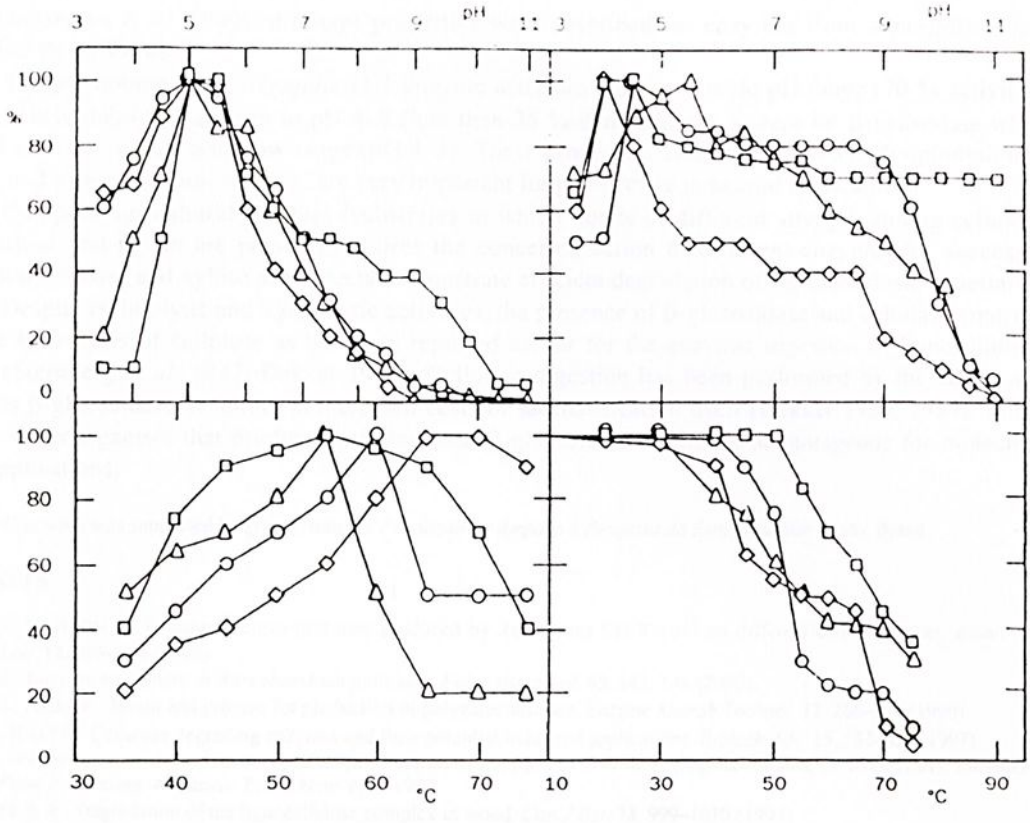


Fig. 2. Effect of pH (*above*) and temperature (*below*, °C) on the enzyme activity (*left*, relative %) and enzyme stability (*right*, residual activity, %); buffers: sodium acetate (pH 3.0–5.0), citrate–phosphate (pH 5.0–7.0), Tris–HCl (pH 7.0–8.5), Tris–Glycine (pH 8.5–11.0). *circles* – β-glucosidase, *triangles* – xylanase, *squares* – polygalacturonase, *diamonds* – β-xylosidase

The presence of xylanase activity in media containing pectin as the sole carbon source suggested the induction of enzyme synthesis by pectin. Industrial citrus pectin preparations contain neutral sugars such as xylose, arabinose and rhamnose, in the side chains of pectin (Kravtchenko *et al.* 1992; Thakur *et al.* 1997) which were considered to be xylanase inducers (Karni *et al.* 1993; Flores *et al.* 1996). In addition, polygalacturonase induction on xylan media could be due to acidic side-chain residues (present in higher amounts in hardwood xylan used), which could be released by enzymes from the hemicellulolytic complex as oligogalacturonides of different size (Perley and Page 1971; Poutanen *et al.* 1991; Ferreira-Filho 1994). On the other hand, it has been suggested that some microorganisms can produce low levels of basal constitutive activities that degrade the polymeric substrate (Aguilar and Huitrón 1990); however, the activity of these enzymes detected in the media does not correspond to the basal level found.

Table I. Products[a] of enzyme hydrolysis of agricultural residues

Time, h	Corn husk		Orange bagasse	
	Products	Reducing sugar, g/L	Products	Reducing sugar, g/L
2	Glc	0.78	Glc	0.65
4	Glc, Xyl	0.85	Glc, Xyl	0.72
6	Glc, Xyl	1.00	Glc, Xyl	1.10
12	Glc, Xyl	1.15	Glc, Xyl, GalUA	1.20
24	Glc, Xyl	1.20	Glc, Xyl, GalUA	1.45
36	Glc, Xyl	1.20	Glc, Xyl, GalUA	1.70

[a]GalUA – galacturonic acid, Glc – glucose, Xyl – xylose

The physico-chemical characteristics of the enzymes studied were similar to other polysaccharide depolymerizing enzymes of fungal origin (Saha and Bathast 1996; Soares *et al.* 1999; Gunata and Vallier

1999; Manzanares *et al.* 1999); different properties were described for enzymes from *Aspergillus niger* (Bailey and Pessa 1990).

The pH optima of *C. inaequalis* 11.1 enzyme activities were in a wide pH range (70 % activity at pH 4–6). Their stability was high in pH 4–8 (less than 25 % denaturation), except for β-xylosidase which exhibited stability in only a narrow range (pH 4–5). These properties, associated with a high optimum temperature, and a high thermoresistance, are very important for prospective industrial applications.

Complex agricultural residues (substrates in which bonds of different strength among cellulose, hemicellulose and pectin are present) requires the concerted action of different enzymes for successful degradation (glucose and xylose as products demonstrate efficient degradation of lignocellulosic materials).

Despite cellulolytic and xylanolytic activities, the presence of β-glucosidase and cellulase contributes to the hydrolysis of cellulose as has been reported earlier for the enzymic digestion of lignocellulosic residues (Sternberg *et al.* 1977; Dekker 1986). Cellulase digestion has been performed by the addition of exogenous β-glucosidase, resulting in increased costs of saccharification itself (Dekker 1989, 1994). Therefore, any microorganism that produces cellulase and β-glucosidase would be advantageous for biotechnological applications.

This work was supported by grants from the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*, Brasil.

REFERENCES

AGUILAR G., HUITRON C.: Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* CH-Y-1043 on different carbon sources. *Biotechnol. Lett.* **12**, 655–660 (1990).

AUGUSTIN J.: Enzyme equipment in *Aureobasidium pullulans*. *Folia Microbiol.* **45**, 143–146 (2000).

BAILEY M.J., PESSA E.: Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microb. Technol.* **12**, 266–271 (1990).

BHAT M.K., BHAT S.: Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotech. Adv.* **15**, 583–620 (1997).

BIGIELIS R.: Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufacture, pp. 363–399 in T. Nagodawithama, G. Reed (Eds): *Enzymes in Food Processing*. Academic Press, New York 1993.

BLANCHETTE R.A.: Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.* **73**, 999–1010 (1994).

BUSWELL J.A., CAI Y.J., CHANG S.T., PETERDY J.F., FU S.Y., YU H.S.: Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. *World J. Microb. Biotech.* **12**, 537–542 (1996).

CHAHAL D.S.: Production of *Trichoderma reesei* cellulase system with high hydrolytic potential by solid-state fermentation, pp. 247–269 in G.F. Leathem, M.E. Himmel (Eds): *Enzymes in Biomass Conversion, ACS Symposia Ser. 460*. American Chemical Society, Washington 1991.

DA SILVA R., FRANCO C.M.L., GOMES E.: Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. *Bol. Soc. Brasil. Cienc. Tecnol. Alimen.* **31**, 249–260 (1997).

DEKKER R.F.H.: Kinetic, inhibition and stability properties of a commercial β-glucosidase (cellobiase) preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 1438–1442 (1986).

DEKKER R.F.H.: Enzymatic hydrolysis of plant polysaccharides: substrates for fermentation. *Brasilian J. Med. Biol. Res.* **22**, 1441–1456 (1989).

DEKKER R.F.H.: Enzymes in food beverage processing – 2. *Food Austral.* **46**, 179–181 (1994).

DE-PAULA E.H., RAMOS, L.P., AZEVEDO M.O.: The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. *Biores. Technol.* **68**, 35–41 (1999).

DURAN N., ESPOSITO E., INNOCENTINI-MEI L.H., CANHOS V.P.: A new alternative process for Kraft E1 effluent treatment: A combination of photochemical and biological methods. *Biodegradation* **5**, 13–19 (1994).

FERREIRA-FILHO E.X.: The xylan-degrading enzyme system. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **27**, 1093–1109 (1994).

FLORES M.E., PEREA M., RO O., MALVAEZ A., HUITRON C.: Physiological studies on induction and catabolite repression of β-xylosidase and endoxylanase in *Streptomyces* sp. CH-M-1035. *J. Biotechnol.* **49**, 179–187 (1996).

GUIRAUD P., STEIMAN R., AIT-LAYDI L., SEIGLE-MURANDI F.: Degradation of phenolic and chloroaromatic compounds by *Coprinus* spp. *Chemosphere* **38**, 2775–2789 (1999).

GUNATA Z., VALLIER M.J.: Production of a highly glucose-tolerant extracellular β-glucosidase by three *Aspergillus* strains. *Biotechnol. Lett.* **21**, 219–223 (1999).

KARNI M., DEOPURKAR R.L., RALE V.B.: β-Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* grown on sugars and agricultural residues. *World J. Microb. Biotechnol.* **9**, 476–478 (1993).

KOLAROVA N., AUGUSTIN J.: Production of polysaccharide hydrolases in the genus *Rhizopus*. *Folia Microbiol.* **46**, 255–258 (2000).

KRAVTCHENKO T.P., VORAGEN A.G.J., PILNIK W.: Analytical comparison of three industrial pectin preparations. *Carbohydr. Polym.* **18**, 17–25 (1992).

KRISTUFEK D., ZELINGER S., KUBICEK C.P.: Regulation of β-xylosidase formation by xylose in *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 713–171 (1995).

MANZANARES P., RAMON D., QUEROL A.: Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the production of β-D-xylosidase activity. *Internat. J. Food Microbiol.* **46**, 105–112 (1999).

MILLER G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**, 426–428 (1959).

MYBURGH J., PRIOR B.A., KILIAN S.G.: Production of xylan-hydrolyzing enzymes by *Aureobasidium pullulans*. *J. Ferment. Bioeng.* **72**, 135–137 (1991).

OUDOT J., DUPONT J., HALOUET S., ROQUEBERT M.F.: Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi. *Soil Biol. Biochem.* **25**, 1167–1173 (1993).

PERLEY A.F., PAGE O.T.: Differential induction of pectolytic en... nes of *Fusarium roseum* (Lk). *Can. J. Microbiol.* **17**, 415–420 (1971).

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

POUTANEN K, TENKANEN M, KORTE H, PULS J Accessory enzymes involved in the hydrolysis of xylans. pp 247–269 in G F Leathem, M E Himmel (Eds) *Enzymes in Biomass Conversion. ACS Symposia Ser 460*. American Chemical Society, Washington 1991

RODRIGUEZ COUTO S, RIVELA I, MUÑOZ M R, SANROMAN A Stimulation of ligninolytic enzyme production and the ability to decolorize polyR-478 in semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Tech* **74**, 159–164 (2000)

SAHA B C, BOTHAST R Glucose tolerant and thermophilic β-glucosidases from yeasts. *Biotechnol Lett* **18**, 155–158 (1996)

SARKANEN S Enzymatic lignin degradation: an extracellular view. pp 247–269 in G F Leathem, M E Himmel (Eds) *Enzymes in Biomass Conversion. ACS Symposia Ser 460*. American Chemical Society, Washington 1991

SOARES M M C N, DA SILVA R, GOMES E Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Rev Microb* **30**, 229–303 (1999)

STERNBERG D, VIJAYAKUMAR P, REESE E T β-Glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose. *Can J Microbiol* **23**, 139–147 (1977)

SUNNA A, ANTRANIKIAN G Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit Rev Biotechnol* **17**, 39–67 (1997)

TAVARES V B, SIVIERI K, CERON C R, DA SILVA R, TRABUCO E, GOMES E Utilização do resíduo líquido de industria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. *Química Nova* **21**, 722–725 (1998)

THAKUR R B, SINGH R K, HANDA A K Chemistry and uses of pectin – a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **37**, 47–73 (1997)

Production, Characterization, and Properties of β-Glucosidase and β-Xylosidase from a Strain of *Aureobasidium* sp.[1]

T. Iembo*, R. da Silva*, F. C. Pagnocca, and E. Gomes***

* *Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil; e-mail: eleni@bio.ibilce.unesp.br*

** *Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil*

Received August 3, 2001

Abstract—β-Glucosidase and β-xylosidase production by a yeastlike *Aureobasidium* sp. was carried out during solid-state and submerged fermentation using different carbon sources and crude enzymes were characterized. β-Glucosidase and β-xylosidase exhibited optimum activities at pH 2.0–2.5 and 3.0, respectively. These enzymes had the maximum activities at 65°C and were stable in a wide pH range and at high temperatures.

Production and characterization of microbial degradative enzymes has important practical implementations. These are obtaining new enzymes to be used in commercial applications and new information that allows more effective use or improvement of microbial cultures. Many microorganisms, including fungi, bacteria, and actinomycetes, produce enzymes that are capable of degrading plant cell walls, fulfilling an important function in the decomposition and biogeochemical cycling of biomass [1].

In addition, the use of these enzyme preparations as processing aids has become common practice in fruit juice and wine production [2]. In winemaking, flavor compounds play an important role. Monoterpenes are important constituents of the flavor of grapes, as are their fermenting products (wine) [3]. The study of these compounds has demonstrated that, besides a free volatile fraction, they naturally exist as nonodorous and nonvolatile glycoside forms. In general, glycoside forms are more abundant than free ones [4]. The aromatic potential is naturally revealed during fruit maturation by endogenous β-glucosidases [5]. Since these enzymes have low activities and cannot release the whole aromatic potential, the use of exogenous β-glucosidases in winemaking has been proposed in order to increase the amount and quality of the flavor [3, 5, 6]. However, the enzyme used in this application should be active at low pH and stable in the presence of ethanol [7].

The yeastlike *Aureobasidium* genus has been recognized as a producer of a number of products of industrial importance. *A. pullulans* is an excellent producer of amylases, xylanases, β-glucosidase [8], and pectolytic and β-mannanolytic enzymes [9, 10].

This study sought to investigate the production of β-glucosidase and β-xylosidase from the yeastlike strain of *Aureobasidium* sp. isolated from orange juice.

Some physical and chemical characteristics of these enzymes produced in media with specific substrates and agricultural residues were studied.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism. The yeastlike strain used in this study was isolated from orange juice processing waste and maintained on PDA (potato dextrose agar-oxoid) slopes as a stock culture. The genus was identified according to de Hoog [11].

Cultivation of the microorganism and enzyme production. Production of enzymes by solid-state fermentation (SSF) (moisture content, 67%) was carried out using a 250-ml Erlenmeyer flask containing 5 g of wheat bran and 10 ml of a nutrient solution containing 0.3% $(NH_4)_2SO_4$; 0.15% KH_2PO_4; 0.02% $MgSO_4$, 0.05% CaO; 0.02% ZnO; 0.27% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 0.01% $CoCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.01% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, and 0.003% H_3BO_3. Sterilized medium was inoculated with 10^6 cells per gram of wheat bran and maintained at 28°C. The cultivation was carried out for 192 h. At 24-h intervals, the solid fermented material was mixed with 25 ml of distilled water (an equal volume of the SSF medium), stirred, filtered by vacuum, and centrifuged. The supernatant was used as a crude enzyme solution.

Submerged fermentation (SmF) was carried out using 125-ml Erlenmeyer flasks containing 25 ml of liquid medium composed of 1% carbon source (xylan or citrus pectin) and the nutrient solution described above. The medium was inoculated with 10^6 cells per milliliter of the medium, and the cultures were grown in a rotary shaker (150 rpm) at 28°C. The biomass produced by SmF was separated by centrifugation at 10000 *g* for

[1] This article was submitted by the authors in English.

0003-6838/02/3806-0549$27.00 © 2002 MAIK "Nauka/Interperiodica"

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

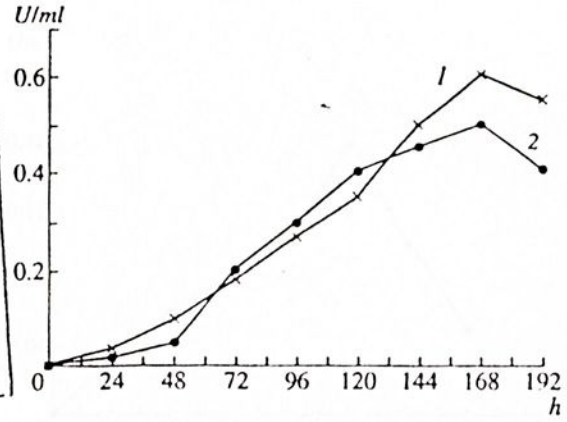


Fig. 1. Production of enzymes by *Aureobasidium* sp. during SSF using wheat bran as a substrate at 28°C. (*1*) β-xylosidase; (*2*) β-glucosidase.

20 min. The cell-free medium was used as a crude enzyme solution.

Enzyme activity measurements. The β-xylosidase activity was measured by the release of ρ-nitrophenol from ρ-nitrophenyl-β-*D*-xylopyranoside (Sigma) used as a substrate in a mixture containing 200 μl of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 3.5), 50 μl of a 2 mM substrate solution, and 100 μl of crude enzyme. The reaction was stopped with 1 ml of 2 M Na_2CO_3, and the β-nitrophenol released was quantified spectrophotometrically at 410 nm. The β-glucosidase activity was assayed in the same way as the β-xylosidase activity but using β-nitrophenyl-β-*D*-glucoside as a substrate. One enzyme unit was defined as the amount of enzyme which released one μmol of ρ-nitrophenol per minute under the assay conditions.

Enzyme characterization. The crude enzyme solution obtained in SSF at 28°C for 120 h using wheat bran as a substrate was used for enzyme characterization.

Optimum pH and temperatures for enzyme activity. The enzyme activity was measured at 40°C and different pH values obtained by the use of different buffers: glycine–HCl (pH 2.0–2.5), sodium acetate (pH 3.0–5.0), citrate–phosphate (pH 5.0–7.0), Tris–HCl (pH 7.0–8.5), and glycine–NaOH (pH 8.5–11.0). The optimum temperature was determined in experiments with incubation of the reaction mixture at temperatures from 35 to 70°C and optimum pH.

Thermostability. The enzyme solution was incubated at different temperatures (10–70°C) for 1 h at pH 5.0. An aliquot was taken and placed on ice before assaying the residual enzyme activity at optimum pH and temperature.

pH stability. Crude enzyme preparation was dispersed in 0.1 M buffer solutions at pH 2.0–10.5 using the McIlvaine buffer (1 : 1) and incubated at 25°C for 24 h. An aliquot was assayed for the remaining activity at the pH and temperature optimum for the enzyme.

RESULTS AND DISCUSSION

Enzyme production during SSF. The yeastlike *Aureobasidium*, when grown in a medium containing wheat bran, produced β-glucosidase and β-xylosidase (Fig. 1). Enzyme production during SSF was analyzed for 7 days. The β-xylosidase and β-glucosidase activities were the highest after 168 h of cultivation.

β-Glucosidase and β-xylosidase production were high (0.5 and 0.6 U/ml, respectively) compared with levels reported for *Aureobasidium pullulans* and species of *Pichia, Hanseniaspora,* and *Zygosaccharomyces* [12–14]. However, high rates of β-glucosidase production were reported for *Pichia kodamae* and *P. mississippiensis* (2.59 and 2.53 U/ml, respectively) [15]. The comparison of the amounts of enzymes produced by different organisms is not absolutely adequate, because the culture conditions were different. Nevertheless, these data may be used as a rough estimate of the potential of the strain for enzyme production.

Several yeast genera have been reported to be β-glucosidase producers [16], although β-xylosidase production is usual in many filamentous fungi [17] and has been described only in a few genera, such as the yeastlike *Aureobasidium* and *Trichosporon* [18, 19].

Enzyme production during SmF. The time course of enzyme production in liquid media was studied. When 1% citrus pectin was the only carbon source, β-glucosidase production reached maximum values (0.16 U/ml) after 120 h of cultivation and no β-xylosidase activity was detected (Fig. 2).

When xylan was the carbon source, both enzymes were produced. The yeast produced the highest quantity of β-xylosidase (0.22 U/ml) after 120 h of cultivation (Fig. 3). The peak of p-glucosidase production (0.18 U/ml) in this medium was obtained after 72 h.

The β-glucosidase activity was detected in all of the media used, and the experiments with glucose as the only carbon source also indicated the presence of this enzyme after 120 h of cultivation of the *Aureobasidium* sp. strain (data not shown). Although further studies are necessary, we can already suggest the presence of a constitutive β-glucosidase.

The presence of β-xylosidase secreted by *Aureobasidium* contrasts with data on many microorganisms in which these enzymes remain cell-associated [20, 21], though a somewhat different situation was found in *Aureobasidium pullulans,* where a considerable quantity of β-xylosidase was secreted into the medium [22].

The solid-state fermentation system ensured a higher enzyme production rate compared to submerged fermentation, provided that th.e volume of distilled water (25 ml) used for extraction of the solid fermented material was the same as in the SmF.

Crude enzyme characterization. Characterization of the β-glucosidase and xylosidase activities in the crude enzyme solution obtained from *Aureobasidium* sp. cul-

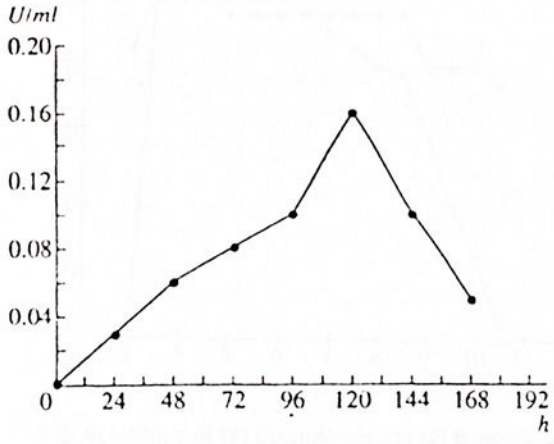


Fig. 2. Production of β-glucosidase by *Aureobasidium* sp. during SmF using pectin as a carbon source.

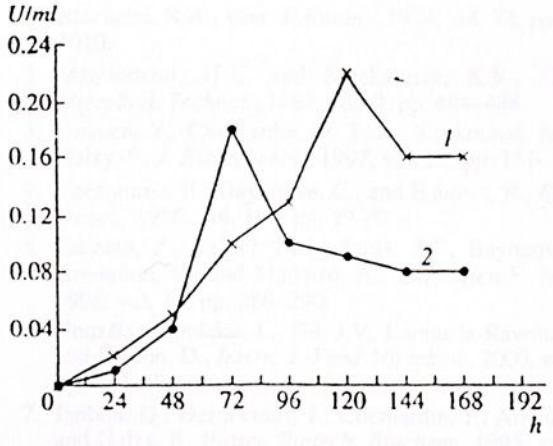


Fig. 3. Production of enzymes by *Aureobasidium* sp. during SmF using xylan as a carbon source. (*1*) β-xylosidase; (*2*) β-glucosidase.

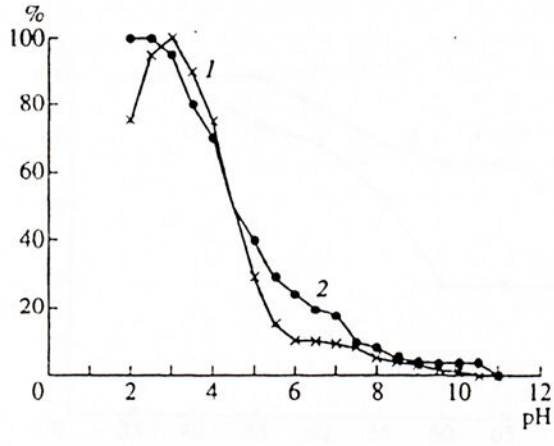


Fig. 4. Effect of pH on the activities of (*1*) β-xylosidase and (*2*) β-glucosidase produced by *Aureobasidium* sp. during SSF. The enzyme activities were measured at 40°C. Buffers: glycine–HCl (pH 2.0–2.5), sodium acetate (pH 3.0–5.0), citrate–phosphate (pH 5.0–7.0), Tris–HCl (pH 7.0–8.5), Tris–glycine (pH 8.5–11.0).

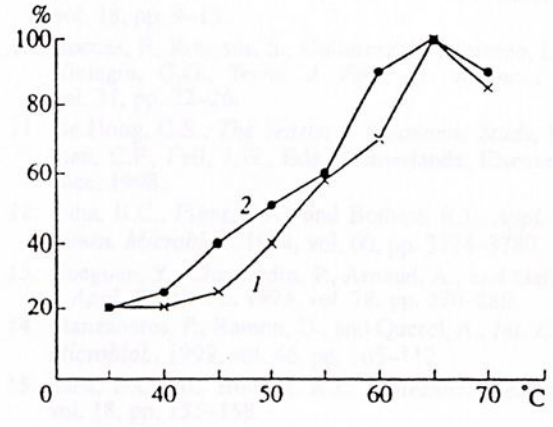


Fig. 5. Effect of temperature on the activity of (*1*) β-xylosidase and (*2*) β-glucosidase produced by *Aureobasidium* sp. during SSF. pH 2.5, 3.0, and 4.5, respectively.

tivated on wheat bran was carried out. β-Glucosidase had an optimum pH of about 2.0–2.5 and β-xylosidase, an optimum pH of about 3.0 (Fig. 4). The optimum temperature for the activity of these enzymes was 65°C (Fig. 5). β-Glucosidase was stable in a large pH range (2.0–10.5), retaining 75% of its activity at pH 11.0. β-Xylosidase was more sensitive; it was stable at pH 3.5–7.0, retaining 80% of its activity at pH 8.5 (Fig. 6). When kept at 40°C for 60 min, the activity of β-glucosidase was 95% of the initial level, and 80% of its activity was retained at 50°C. β-Xylosidase retained 100 and 75% of its activity after 1 h at 45 and 65°C, respectively (Fig. 7).

β-Glucosidase and β-xylosidase from *Aureobasidium* sp. displayed maximum activities at more acidic pH than those optimum for other yeasts. These enzymes from fifteen yeast strains studied by Saha and Bothast [15] had optimum pH values varying from 4.5 to 6.5. pH optimums of the β-glucosidases of *Debaromyces hansenii* [23], *Candida peltata* [24], *Zygosaccharomyces bailii* [13], *Aureobasidium* sp. [25], and *A. pullulans* [12] also fall within this range. β-Xylosidases of many yeasts have also been reported to have acidic (4.5–5.0) or neutral (6.5–7.5) pH optimums [14].

Crude *Aureobasidium* enzymes demonstrated optimum activities and stabilities at high temperature. This information is important, because it means that these enzymes have industrially valuable characteristics. The main impediments to the exploitation of commercial enzymes are their yield, stability, specificity, and the cost of production. New commercially important enzymes with desired biochemical, physical, and chemical characteristics and a low cost of production must be the focus of research.

unesp

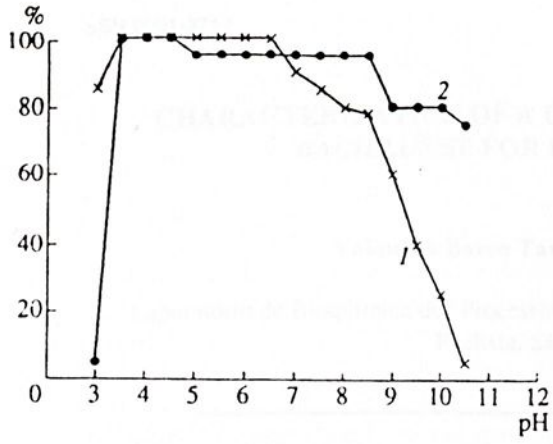


Fig. 6. Stability of (*1*) β-xylosidase and (*2*) β-glucosidase produced by *Aureobasidium* sp. versus pH. The residual activities of β-xylosidase and β-glucosidase were assayed at optimum pH and temperature.

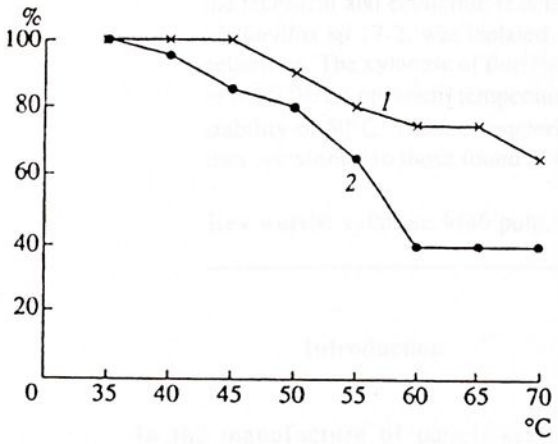


Fig. 7. Stability of (*1*) β-xylosidase and (*2*) β-glucosidase produced by *Aureobasidium* sp. versus temperature. Crude enzyme was incubated at various temperatures (10–70°C) for 1 h at pH 4.5. An aliquot was tested for the remaining activity at optimum pH and temperature.

β-Glucosidase and β-xylosidase have been used in enological applications (for releasing glycosides from monoterpenes) [26]. The action of the β-glucosidase and β-xylosidase of *Aureobasidium* in acidic pH (2.5 and 3.0) could be of interest for this process, because the usual pH range in winemaking is 3.0–3.8 [3]. Their optimum activity and high stability at high temperatures make it possible to avoid the undesirable growth of mesophilic contaminants in industrial applications.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERENCES

1. Blachette, R.A., *Can. J. Botany*, 1994, vol. 73, pp. 999–1010.
2. Manonmani, H.K. and Sreekantiah, K.R., *Enzyme Microbiol. Technol.*, 1987, vol. 9, pp. 484–488.
3. Gueuen, Y., Chemardin, P., Pien, S., Arnaud, A., and Galzy, P., *J. Biotechenol.*, 1997, vol. 55, pp. 151–156.
4. Cordonnier, R., Bayonove, C., and Baumes, R., *Rev. Fr. Oenol.*, 1986, vol. 102, pp. 29–41.
5. Guinata, Z., Vallier, M.J., Sapis, J.C., Bayonove, C., Arnaudon, V., and Madarro, A., *Enz. Microb. Techol.*, 1996, vol. 18, pp. 286–290.
6. González-Candelas, L., Gil, J.V., Larmuela-Raventós, D., and Ramón, D., *Intern. J. Food Microbiol.*, 2000, vol. 59, pp. 179–183.
7. Janbon, G., Derancourt, J., Chemardin, P., Arnaud, A., and Galzy, P., *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1995, vol. 59, pp. 1320–1322.
8. Biely, P., Heinrichová, K., and Kruziková, M., *Current Microbiol.*, 1996, vol. 33, pp. 6–10.
9. Rombouts, P.M. and Pilnik, W., *Process Biochem.*, 1978, vol. 18, pp. 9–13.
10. Boccas, F., Roussos, S., Gutierrez, M., Serrano, L., and Viniegra, G.G., *Techn. J. Food Sc. Technol.*, 1994, vol. 31, pp. 22–26.
11. De Hoog, G.S., *The Yeasts: A Taxonomic Study*, Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Eds., Netherlands: Elsevier Science, 1998.
12. Saha, B.C., Freer, S.N., and Bothast, R.J., *Appl. Enviromen. Microbiol.*, 1994, vol. 60, pp. 3774–3780.
13. Gueguen, Y., Chemardin, P., Arnaud, A., and Galzy, P., *J. Appl. Bacteriol.*, 1995, vol. 78, pp. 270–280.
14. Manzanares, P., Ramon, D., and Querol, A., *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, vol. 46, pp. 105–112.
15. Saha, B.C. and Bothast, R.J., *Biotechnol. Lett.*, 1996, vol. 18, pp. 155–158
16. Kumar, S. and Ramón, D., *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996, vol. 135, pp. 287–293.
17. Myburgh, J., Prior, B.A., and Kilian, S.G., *J. Ferment. Bioeng.*, 1991, vol. 72, pp. 135–137.
18. Blanco, P., Sieiro, C., and Villa, T.G., *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, vol. 175, pp. 1–9.
19. Domsch, K.H. and Gams, W., *Soil Biol. Biochem.*, 1969, vol. 1, pp. 29–36.
20. Flores, M.E., Perea, M., Ro, O., Malváez, A., and Huitrón, C., *J. Biotechnol.*, 1996, vol. 49, pp. 179–187.
21. Kristufek, D., Zeilinger, S., and Kubicek, C.P., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, vol. 42, pp. 713–171.
22. Kremnicky, L. and Biely, P., *Biochem. Biophys. Acta*, 1998, vol. 1425, pp. 560–566.
23. Rosi, I., Vinella, M., and Domizio, P., *J. Appl. Bacteriol.*, 1994, vol. 77, pp. 519–527.
24. Saha, B.C. and Bothast, R.J., *Appl. Enviromen. Microbiol.*, 1996, vol. 62, pp. 3165–3170.
25. Hayashi, S.H., Matsumoto, K., Wada, Y., Takasaki, Y., and Imada, K., *Lett. Appl. Microbiol.*, 1993, vol. 17, pp. 75–77.
26. Shoseyov, O., Bravdo, B.A., Siegel, D., Goldman, A., Cohen, S., Shoseyov, L., and Ikan, R., *J. Agric. Food Chem.*, 1990, vol. 38, pp. 1387–1390.

ISSN 0001-3714

CHARACTERIZATION OF A CELLULASE-FREE XYLANASE PRODUCING *BACILLUS* SP FOR BIOBLEACHING OF KRAFT PULP

Valquíria Barco Tavares, Eleni Gomes, Roberto Da Silva*

Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brazil

ABSTRACT

Application of the xylanase in the pulp bleaching process has been shown to be effective in decreasing the amount of chlorinating agents in the process and improving the brightness of the pulp. The use of thermostable cellulase-free xylanase might enhance both the technical and economic feasibility of the process. In this work an alkalophylic strain of *Bacillus* sp 77-2, was isolated which showed a high production of xylanase and free cellulases. The xylanase of *Bacillus* sp displayed an optimum pH of 6.0 (with 70% activity at pH 9.0), an optimum temperature of 60°C, pH stability in the range 5-10 and thermal stability of 50°C. These characteristics are important to the kraft pulp bleaching because they are similar to those found in the industrial paper environment.

Key words: xylanase, kraft pulp, biobleaching

Introduction

In the manufacture of paper, kraft pulp is traditionally prepared using chlorine bleach to oxidize and remove lignin to achieve better product brightness. This process releases chlorine compounds that damage the environment. Consequently attempts have been made to remove or reduce the chlorine levels that are used in this process (2). One of the approaches for reducing environmental pollution is to use enzymes in the bleaching. Application of xylanase in the pulp bleaching process has been shown to be effective in decreasing the amount of chlorinating agents needed and improving the brightness of pulp in the bleaching by totally chlorine free (TCF) process (7). The xylanase applied to the pulp needs be free of cellulases, which degrade the cellulose, decrease the viscosity leading to reduced yields. Xylanases produced by mesophilic fungi or bacteria, however are not thermostable, resulting in low hydrolytic efficiencies. The use of thermostable xylanases at high temperatures over prolonged periods of time might enhance both the technical and economic feasibility of the hydrolysis process (4), leading to a cost effective and a more environmentally acceptable process.

Materials and methods

Culture medium. The screening of microorganisms was made in nutrient medium, pH 9.0, as described by Horikoshi (3): 1% beef extract powder, 1% peptone, 1% NaCl, 0.1% KH_2PO_4, 0.5% Na_2CO_3. Corn straw was used as a carbon source, replacing the filter paper (5). The production medium (3) was utilized having as carbon source 1% xylan (Birchwood - Sigma).

Screening of microorganism. Approximately 1 g of compound, culture soil or forest decayed wood was inoculated into test tubes containing 10 ml of

Corresponding author. Mailing address: IBILCE / UNESP, Cristovão Colombo, 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil. E-mail: dasilva@deg.ibilce.unesp.br

screening medium and incubated at 50°C for 120 hours. The culture was then inoculated on plates with same culture medium containing 1.5% bacteriological agar, and incubated at the same temperature. The colonies were subsequently streaked out and transferred to slant cultures. Isolated alkalophilic and thermophilic microorganisms from the slant cultures were inoculated into 20 ml of the same medium without agar in 125 ml Erlenmeyer flasks and incubated at 50°C with shaking at 150 rpm. After 48 hours the bacterium was harvested by centrifugation at 6000 g and 4°C for 20 min. The free cell solution was assayed for enzymatic activity.

Microorganism. The taxonomic study of strain isolated was made until the genus (*Bacillus* sp 77-2) according to the Bergey's manual of determinative bacteriology (8).

Enzyme production by submerged culture. To determine the growth curve and maximal enzymatic production, the *Bacillus* sp 77-2 was inoculated in five 125 ml Erlenmeyer flasks containing 20 ml of production medium and incubated at 50°C with shaking at 150 rpm. Each day the contents at one flask was centrifuged, as noted above, and the enzymatic activities (xylanase, carboximethyl cellulase and avicelase) were determined in the cell free supernatant.

Enzymatic activity determination. The activities of xylanase (1,4-β-D-xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8), carboxymethyl cellulase or CMCase (endo-1,4-β-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.4) and avicelase (exo-1,4-β-D-cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91) were assayed by incubating 0.1 ml of appropriately diluted enzyme with 0.9 ml of solution containing the respective substrate, xylan (Birchwood - Sigma), carboxymethyl cellulose (Sigma-C5678) and or avicel (Merck), prepared in 0.1 M acetate buffer, pH 5.0. After incubation at 60°C for 10 min, the reducing sugars released were assayed colorimetrically by the addition of 1 ml of 3-5-dinitrosalicylic acid reagent (6). One unit of xylanase activity was defined as 1 µmole of xylose or glucose equivalent released per minute.

Optimum pH. The optimum pH was determined by incubating 0.1 ml of enzyme and 0.9 ml of buffers, adjusted to initial pH of 3.0 to 11.0, containing Birchwood xylan (0.5%). The buffers used were: sodium acetate buffer, pH 3.5 - 5.5; Tris-HCl buffer, pH 6.0 - 9.0; Gly-NaOH buffer, pH 9.5 - 10.5. After incubation at 60°C for 10 min, and the released reducing sugars were assayed as described above.

pH stability. The effect of pH on the stability of the xylanase was studied by incubating the enzyme, without substrate, with buffers covering a pH range of 3.5 - 10.5 (as used for optimum pH determinations). After treatment for 24 hours at room temperature, at a given pH, the residual enzymatic activity was determined.

Optimum temperature. The optimum temperature was determined by performing the standard reaction for 10 min, over a temperature range of 45 to 80°C.

Thermal stability. The effect of elevated temperature on the enzyme was accomplished by incubating 0.1 ml of the enzyme at 45 to 80°C for 1 hour. After treatment the residual activity was assayed.

Xylan hydrolysis. The hydrolysis of xylan (Birchwood-Sigma) by crude xylanase was assessed using 0.1 ml of crude enzyme and 0.9ml of xylan in 0.1 M acetate buffer, pH 5.0. This mixture was incubated at 60°C for 5 to 180 min., and the reaction stopped by boiling for 10 min. The products of this reaction were identified by paper chromatography using xylose, xylobiose, xylotriose, xylotetralose and glucose as standards.

Hydrolysis of pulp. The crude xylanase was used to hydrolyze kraft pulp derived from eucalyptus (Champion Paper and Cellulose Ltd., Mogi Guaçu, Brazil). A 1% pulp was prepared in 0.1 M acetate buffer and 9.0 ml of this was incubated with 1 ml of the enzyme at 60°C for 1 to 4 hours. The enzyme was inactivated by boiling for 10 min, and the sugars released were identified by paper chromatography as above.

Hydrolysates identification. The hydrolysates identification was realized by descendent chromatography (9). Samples (20 µl) were spotted onto Whatman nº1 filter paper developed with ethyl acetate/isopropanol/water (6:3:1). The hydrolysis products were visualized with silver nitrate.

RESULTS AND DISCUSSION

Screening of microorganism. Out of 117 samples collected, fifteen microbial cultures were isolated by the above techniques. Besides this, was selected one strain (77-2) of alkalophilic and thermophilic bacterium with growth at 45°C and pH 9.0 that produced high levels of xylanase activity with negligible CMCase and avicelase activity. The isolated bacteria was a Gram positive, rod, formed subterminal spores in a distended vegetative cell, grew in aerobic conditions and produced catalase. On the

basis of these characteristics the bacterium was classified in the genus *Bacillus* (8), and denominated *Bacillus* sp 77-2.

Enzymatic production. Measurements of the enzyme activity and cell growth at a number of time intervals are shown in Fig. 1. The maximum level of cell growth was observed at 48 hours, coinciding with the maximum level of production of xylanase, which then decreased. The CMCase and avicelase activities were low and oscillated.

Enzymatic characteristics. The optimum pH and optimum reaction temperature of the xylanase was 6.0 and 70°C, as shown in Fig. 2 and 3. Fig. 2 shows that the enzyme lost stability below pH 5.0, but maintained stability at alkaline pH. This xylanase was inactive at above 50°C, as shown in Fig. 3. Activity and stability of the xylanase at higher pH and temperature is expected to increase its suitability for application in the paper and pulp industry (1).

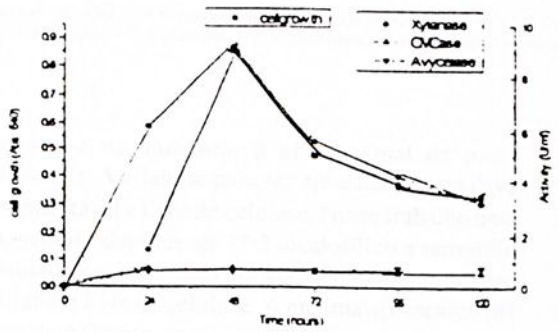


Figure 1 - Cell growth and enzyme production by *Bacillus* sp 77-2

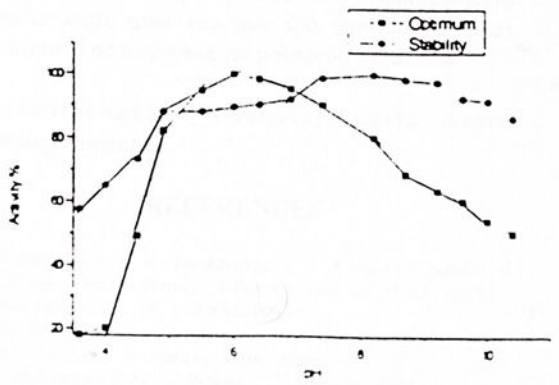


Figure 2 - Optimum pH and stability pH of *Bacillus* sp 77-2 crude xylanase

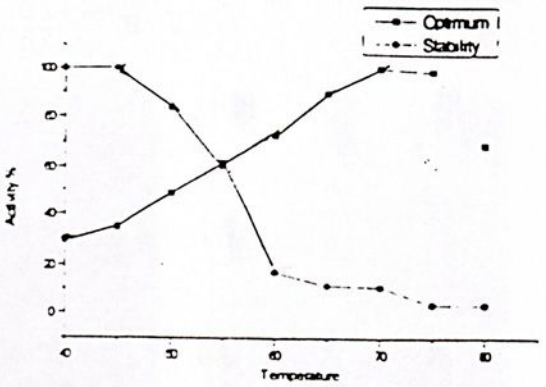


Figure 3 - Optimum temperature and stability temperature of *Bacillus* sp 77-2 crude xylanase

Hydrolysates identification. The products of xylan hydrolysis by *Bacillus* sp 77-2 are shown in Fig. 4. Xylotriose and xylobiose were obtained after 5 minutes of hydrolysis, and xylose was detectable after 1 hour of hydrolysis indicating activity of endo and exoxylanase in the crude supernatant (Fig. 4 A). The main product of pulp hydrolysis found was xylobiose, with xylose found in a smaller quantity (Fig. 4 B). In both cases glucose production was not detected, indicating that cellulase was not produced (Fig. 4 C). This is very important because the presence of cellulase degrade cellulose leading to a decrease in viscosity and yield. These enzymatic properties indicated that the *Bacillus* sp 77-2 crude xylanase is suitable for applications in pulp improvement.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are highly thankful to the Champion Paper Cellulose Ltd., Mogi Guaçu, SP, Brazil for donating the eucalyptus kraft pulp and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

RESUMO

Caracterização de uma xilanase, livre de celulase, produzida por *Bacillus* para o biobranqueamento da pasta kraft

A aplicação de xilanase no estágio de branqueamento da pasta kraft tem mostrado ser um eficiente meio de decrescer o consumo de cloro no

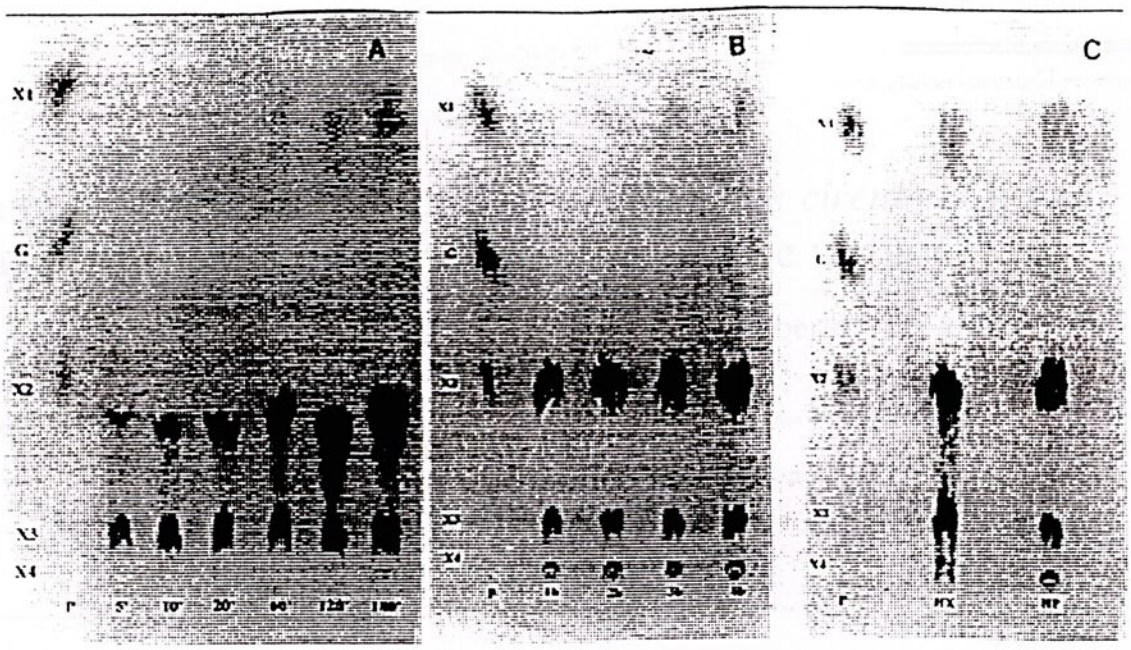


Figure 4 - Products of xylan and pulp hidrolyses by *Bacillus* sp 77-2 xylanase P = standard, X_1 = xylose, X_2 = xylobiose, X_3 = xylotriose, X_4 = xylotetraose, G = glucose, HX = hydrolyse of xylan, HP = hydrolyse of pulp

processo e de aumentar a alvura final da pasta branqueada. A xilanase para ser aplicada à pasta deve ser termostável e livre de celulase. Neste trabalho uma linhagem de *Bacillus* sp 77-2 alcalofílico e termófilo foi isolado e selecionado por apresentar alta produção de xilanase livre de celulase. A enzima apresentou pH ótimo de 6.0 (com cerca de 70% desta atividade em pH 9.0), temperatura ótima a 60°C, pH de estabilidade entre 5 e 10 e foi estável à temperatura de 50°C. Estas características são importantes para o branqueamento da pasta kraft, uma vez que são similares àquelas encontradas no ambiente de polpação industrial.

Palavras chaves: xilanase, pasta kraft, biobranqueamento

REFERENCES

1. Bandivadekar, K. R., Deshpande, V. V. Enhanced stability of cellulose free xylanase from *Cuanna* sp. (NCL 82.5.1). *Biotechnol. Lett.*, 16: 179-182, 1994.
2. Da Silva, R., Yim, D. K. and Park, Y. K. Application of thermostable xylanase from *Humicola* sp. for pulp improvement. *J. Ferm. Bioeng.*, 77: 109-111, 1994.
3. Horikoshi, K. and Atsutawa, Y. Xylanase produced by alkalophilic *Bacillus* No. C-59-2. *Agric. Biol. Chem.*, 37: 2097-2103, 1973.
4. Khasin, A., Alchanati, I., Shoham, Y. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 1725-30, 1993.
5. Mandels, M. and Sternberg, D. Recent Advances in cellulose Technology. *J. Ferment. Technol.*, 54: 267-282, 1976.
6. Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 31: 426-8, 1959.
7. Ratto, M., Marthram, L. M., Ahring, B., Application of thermostable xylanase of *Dictyoglomus* sp. in enzymatic treatment of Kraft pulps. *Appl. Microb. Biotechnol.*, 41: 130-3, 1994.
8. Sneath, P. H. A. Endospore - forming gram positive rods and cocci. In Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. & Holt J. G. (eds.). *Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins company, 2: 1104-1207, 1986.
9. Trevenan, W.E., Protecter, D.P., Harrison, I.G. Detection of sugar on paper chromatograms. *Nature* 166: 444-5, 1950.

ELSEVIER

Process Biochemistry 38 (2002) 727–731

PROCESS BIOCHEMISTRY

www.elsevier.com/locate/procbio

Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology

D.A. Bocchini [a,b], H.F. Alves-Prado [a], L.C. Baida [a], I.C. Roberto [c], E. Gomes [a], R. Da Silva [a,b,*]

[a] *Biochemistry and Applied Microbiology Laboratory, IBILCE – UNESP, Sao Jose do Rio Preto, SP, Brazil*
[b] *Chemistry Institute, UNESP, Araraquara, SP, Brazil*
[c] *Faculty of Chemical Engineering of Lorena, Faenqui, Lorena, SP, Brazil*

Received 26 October 2001; accepted 21 June 2002

Abstract

In this work, a 3^3 factorial design was performed with the aim of optimizing the culture conditions for xylanase production by an alkalophilic thermophilic strain of *Bacillus circulans*, using response surface methodology. The variables involved in this study were xylan concentration (X_1), pH (X_2) and cultivation time (X_3). The optimal response region was approached without using paths of steepest ascent. Statistical analysis of results showed that, in the range studied, only pH did not have a significant effect on xylanase production. A second-order model was proposed to represent the enzymic activity as a function of xylan concentration (X_1) and cultivation time (X_3). The optimum xylan concentration and cultivation time were 5 g/l and 48 h, respectively. Under these conditions, the model predicted a xylanase activity of 19.1 U/ml.
© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Bacillus circulans*; Xylanase; Experimental design; Optimization

1. Introduction

Xylan is the main hemicellulosic polysaccharide found in plant cell walls and is composed of a backbone chain of β-1,4-linked xylosyl residues and short side chains of arabinosyl, glucoronosyl and acetyl residues [1]. Xylan represents a significant resource of renewable biomass and comprises up to 20–35% dry weight of wood and agricultural wastes. For most bioconversion process, xylan must first be converted to xylose or xylo-oligosaccharides [2]. Xylanase (endo-1,4-β-xylanase) and β-xylosidase (β-D-xyloside xylohydrolase) the main constituents of the xylanolytic enzyme system, convert this polysaccharide into a more readily fermentable form [3]. Interest in xylanases has increased over the last years mainly due to the application of these enzymes in paper industries for pulp treatment, improving the effectiveness of conventional bleaching chemicals [4,5]. Xylanases can also be used in fruit juice and wine clarification [6,7]. Most of the reports concerning xylanases deal with the purification and characterization of these enzymes. On the other hand, studies regarding to optimization of culture medium and culture conditions for the production of xylanases are still few in the scientific literature. For development of good fermentation some parameters should be optimized according to the limits of the process, such as pH, temperature, substrate concentration, cultivation time and aeration. Much information can be obtained using experimental designs based on statistical principles, performing a minimum number of experiments [8]. Different statistical designs for medium optimization regarding xylanase production have been reported, among which factorial experiments and response surface methodology (RSM) are included [9–11]. These are useful techniques for approaching the region of optimum response [12]. RSM is a model, consisting of mathematical and statistical techniques, widely used to study the effect of

* Corresponding author. Address: IBILCE – UNESP, Chemistry and Geoscience Department, Cristóvão Colombo Street Number 2265, Jardim Nazare, 15054-000 São Jose do Rio Preto, SP, Brazil. Tel.: +55-17-221-2354; fax: +55-17-221-2356.
E-mail address: dasilva@qeg.ibilce.unesp.br (R. Da Silva).

0032-9592/02/$ - see front matter © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
PII: S0032-9592(02)00207-8

several variables and to optimize different biotechnological process [13,14]. Successful application of factorial design experiments and RSM to enhance xylanase production by several microorganisms, mainly fungi such as *Sclerotium rolfsii* [15], *Thermomyces lanuginosus* [10], *Melanocarpus albomyces* [16] and *Trichoderma longibrachiatum* [17,18] has been reported. Studies regarding optimization of xylanase production by *Bacillus* species are less available in the literature [19] and some of these reports do not cite the use of factorial designs [20].The present work describes the optimization of extracellular xylanase production by the alkalophilic and thermophilic bacteria *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation, with the aim of reducing the costs of this enzyme production.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism

Bacillus circulans D1, isolated from decayed wood, was used in this study. Stock cultures were maintained on culture medium, which was used for the submerged culture, added of 1.5% agar, at 4 °C.

2.2. Cultivation medium

The initial submerged cultivation medium was composed of xylan 10.0 g/l, beef extract 10.0 g/l, peptone 10.0 g/l, NaCl 10.0 g/l, KH_2PO_4 1.0 g/l and Na_2CO_3 5.0 g/l (separately sterilized) [21]. For the experiments of optimization, the cultivation medium was composed of different concentrations of xylan, also varying the medium pH and the time of cultivation, according to the experimental design.

2.3. Shake flask cultivation

The optimization experiments were carried out in 125-ml Erlenmeyer flasks containing 20 ml of cultivation medium. Shake flasks were seeded with inocula, at initial concentration of 4.0×10^6 cells/ml, which were incubated for 12 h at 45 °C under 150 rev/min on the initial cultivation medium cited above. Shake flasks cultures were maintained at 45 °C under 150 rev/min for 24, 48 or 72 h, according to the experimental design.

2.4. Enzyme assays

Xylanase activity was determined by the dinitrosalicylic acid method [22], measuring reducing sugars released as xylose after incubation of 0.1 ml of the enzyme solution with 0.9 ml of a birchwood xylan (Sigma) solution (5.0 g/l) in acetate buffer (pH 5.0, 0.1 M) at 60 °C for 10 min. One unit (U) of enzyme activity is defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of reducing sugar equivalent per minute under the assay conditions.

2.5. Experimental design

A 3^3 factorial design was performed in order to determine the optimal conditions for the production of xylanase by *B. circulans* D1. The dependent variable selected for this study was the enzymic activity, expressed in U/ml, and the independent variables chosen were xylan concentration, medium pH and cultivation time. The range and the levels of these variables are given in Table 1.

2.6. Statistical analysis

STATISTICA, (version 5.0) software from StatSoft Inc., was used for regression and graphical analysis.

3. Results

Based on earlier studies, xylan concentration, medium pH and cultivation time were identified as the major factors affecting xylanase production by *B. circulans* D1. In the present work, these variables were statistically optimized with the help of a 3^3 factorial design using RSM. The experimental design and the results are shown in Table 2. The highest xylanase activity (22.45 U/ml) was observed at run number 12, where the factors xylan concentration, pH and cultivation time were used at their levels intermediary (7.5 g/l), smaller (8.0) and higher (72 h), respectively. This activity was 5.5-fold higher than that observed at run number 25, where the related factors were used at highest levels for X_1 and X_2 and lowest for X_3. Table 3 shows the regression analysis for this experiment, presenting the estimates and hypothesis tests to the coefficients of regression. At the 5% probability level, the linear and quadratic coefficients of X_3 (cultivation time factor), and the coefficient of the interaction X_1X_3 (xylan concentration and cultivation time) were found to be significant. The mathematical model representing the xylanase activity ($\hat{Y}$) in the experimental region studied can be expressed by Eq. (1).

Table 1
Values of independent variables a different levels of the 3^3 factorial design

Independent variables	Symbol	Levels		
		1	0	−1
Xylan (g/l)	X_1	5	7.5	10
pH	X_2	8.0	8.5	9.0
Cultivation time (h)	X_3	24	48	72

Table 2
Experimental design and results of the 3^3 factorial design

Run number	Coded levels			Xylanase activity (U/ml)	
	X_1	X_2	X_3	Observed	Predicted
1	1	−1	−1	11.11	8.62
2	1	−1	0	16.20	8.45
3	1	−1	+1	15.81	9.54
4	1	0	−1	8.17	7.62
5	1	0	0	17.04	17.96
6	1	0	+1	16.12	16.56
7	−1	+1	−1	6.75	8.26
8	−1	+1	0	21.54	19.11
9	−1	+1	+1	18.65	18.22
10	0	−1	−1	6.75	8.31
11	0	−1	0	18.63	19.39
12	0	−1	+1	22.45	18.73
13	0	0	−1	8.10	6.63
14	0	0	0	18.73	18.22
15	0	0	+1	17.04	18.07
16	0	+1	−1	4.70	6.58
17	0	+1	0	18.36	18.69
18	0	+1	+1	18.97	19.05
19	−1	−1	−1	5.59	6.39
20	−1	−1	0	18.75	18.69
21	−1	−1	+1	19.12	19.28
22	−1	0	−1	4.44	3.99
23	−1	0	0	17.64	16.84
24	−1	0	+1	16.60	17.94
25	−1	+1	−1	4.05	3.27
26	−1	+1	0	17.14	16.63
27	−1	+1	+1	17.93	18.24

Table 3
Results of regression analysis of the 3^3 factorial design

Term	Coefficient	*T*-statistic	*P*-value
Intercept	18.225	20.943	0.000
X_1	−0.562	−1.396	0.180
X_1X_1	−0.823	−1.179	0.254
X_2	−0.351	−0.870	0.396
X_2X_2	0.818	1.172	0.257
X_3	5.724	14.207	0.000*
X_3X_3	−5.873	−8.416	0.000*
X_1X_2	−0.680	−1.379	0.186
X_1X_3	1.251	2.535	0.027**
X_2X_3	0.509	1.032	0.316

* Statistically significant at 99% of confidence level.
** Statistically significant at 95% of confidence level.

$$\hat{Y} = 18.22 - 0.56X_1 - 5.72X_3 + 1.25X_1X_3 - 5.87X_3^2 \quad (1)$$

The statistical significance of a second-order model equation was evaluated by the F-test analysis of variance (ANOVA), which showed that this regression is statistically significant at 99% confidence level. The model did not show lack-of-fit and presented a high determination coefficient ($R^2 = 0.92$), explaining 92% of the variability in the response (Table 4).

The response surface described by the model equation (1) to estimate xylanase activity over independent variables xylan concentration (X_1) and cultivation time (X_3) is shown in Fig. 1. There is a rather broad plateau region over which the enzyme activity changes relatively little when xylan concentration is varied. Xylanase activities practically identical were observed in experimental runs when the factor cultivation time was used as 48 or 72 h, independently of the xylan concentration used. The production of xylanase reaches a peak in the region of levels '0' and '+1' for the factor cultivation time and the level '0' for the factor xylan concentration, respectively (Fig. 1). As observed, the pH in the range studied (8.0–9.0), did not influence xylanase production and it was maintained around 9.0.

Based on the model obtained, the optimal working conditions were defined to attain high xylanase activity minimizing the xylan concentration and the cultivation time. Thus, the point assigned as optimum corresponded to 5.0 g/l of xylan concentration and 48 h of cultivation time. Under this condition, the model predicted a xylanase activity of 19.1 U/ml being possible a variation of 17.5–21.1 U/ml.

4. Discussion

Over the last few decades, even though several papers regarding optimization of xylanase production have been reported, little information about the optimization of this enzyme production by submerged fermentation, using *Bacillus* species, is available in the scientific literature. Some of these studies with bacteria have not reported the use of statistical designs [23,24].

B. circulans D1 is a good producer of thermostable cellulase-free xylanase. From the 3^3 factorial experiment a response surface was given and indicated that, after a period of incubation, xylanase production does not increase, even though a high xylan concentration is used. The highest enzyme production (22.45 U/ml) achieved with the 3^3 factorial design was approximately 315% higher than production on the initial medium.

Different statistical experimental designs were combined by Pham et al. [19] with the aim of optimizing a culture medium for the production of xylanase by *Bacillus* sp I-1018. The xylan, casein hydrolysate and NaCl concentration were optimized by means of surface response. The optimum composition of the nutrient medium was determined and found to be 3.16 g/l xylan, 1.94 g/l casein hydrolysate and 0.8 g/l NaCl. The highest xylanase production observed was, approximately, 151 U/ml. The cultivation of *Bacillus* sp I-1018 in the optimized medium resulted in an increase of 135% on xylanase production, compared to the initial medium.

Surface response methods were also used to optimize a culture medium with regard to xylanase production by

Table 4
Analysis of variance (ANOVA) for the model regression representing xylanase activity

Source	SS	DF	MS	*F*-ratio	*P*-value
Model	821.17	4	205.293	65.74	< 0.001
Residual	68.7005	22	3.12275		
Total (corr.)	889.871	26			

$R^2 = 0.92$. SS, sum of squares; DF, degrees of freedom; MS, mean square

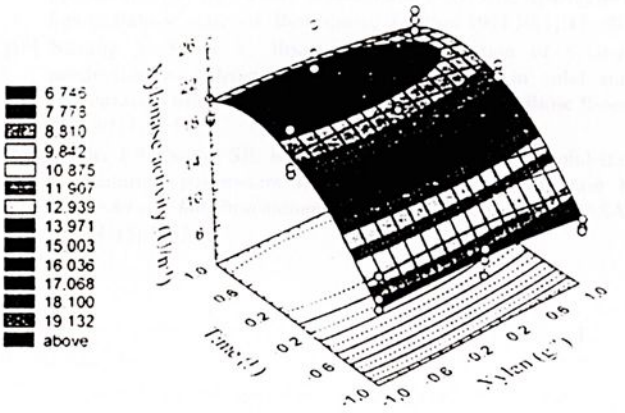


Fig. 1. Response surface described by the model $\hat{y}$, which represents xylanase activity (U/ml) as a function of xylan concentration and cultivation time.

a *Schizophyllum commune* strain [14]. The optimum concentrations of avicel, yeast extract and NH_4NO_3 (73.4, 55.5 and 1.38 g/l, respectively) were determined by a central composite design. The highest xylanase production (5.74 U/ml), resulted in an increase of 330% compared to the initial medium and was reached within 11 days, a very long period of cultivation.

The cultural conditions for thermostable xylanase production of *Thermomyces lanuginosus* were studied by Purkarthofer et al. [10]. An experiment using central composition was performed to optimize the medium components concentrations. When the fungus was grown in the optimized medium (31.2 g/l corn cob, 30.2 g/l yeast extract and 5.0 g/l KH_2PO_4), the highest xylanase production (2.70 U/ml) was observed within 7 days.

In the present work, the increase in xylanase production is comparable with those observed by Haltrich et al. [12] and higher than that observed by Pham et al. [19]. In addition, the highest xylanase activity was reached in a shorter time period in comparison to those observed by Haltrich et al. [12] and Purkarthofer et al. [10]. With the present study it was possible to determine the parameters of 5.0 g/l and 48 h of cultivation time as the better conditions for enzyme production. pH did not influence this production and it was fixed around 9.0. It can be concluded that the study of optimization of culture conditions for xylanase production by *B. circulans* D1 a to an increase of 315% in enzyme production and a decrease of 50% of the xylan amount initially used. These facts are important in making the whole process economically more feasible, in view of the high cost of pure xylan and the difficulty of its extraction from vegetable material, as has been proposed from some agricultural residues. The alkalophilic pH of the cultivation medium and the high temperature used also reduce the chances of contamination by opportunist microorganisms.

Acknowledgements

We thank FAPESP for financial support.

References

[1] Kubata BK, Takamizawa K, Kawai K, Suzuki T, Horitsu H. Xylanase IV, an endoxylanase of *Aeromonas caviae* ME-1 which produces xylotetraose as the only low molecular weight oligosaccharide from xylan. App Environ Microbiol 1995;61:1666–8.

[2] Chen C, Chen JL, Lin TY. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production. Enzyme Microbiol Technol 1997;21:91–6.

[3] Ghosh M, Amitabha D, Mishra AK, Nanda G. *Aspergillus sydowii* MG 49 is a strong producer of thermostable xylanolytic enzymes. Enzyme Microbiol Technol 1993;15:703–9.

[4] Buchert J, Tenkanen M, Kantelinen A, Viikari L. Application of xylanases in the pulp and paper industry. Bioresource Technol 1994;50:65–72.

[5] Da Silva R, Yim DK, Park YK. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp for pulp improvement. J Ferment Bioeng 1994;77(1):109–11.

[6] Biely P. Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol 1985;3(11):286–90.

[7] D. Silva R, Franco CML, Gomes E. Substrato, Ação, Produção e Aplicação de pectinases, hemicelulases e celulases no processamento de alimentos: revisão. Bol SBCTA 1997;31(2):249–60.

[8] Neto BB, Scarminio SL, Bruns ER. Planejamento e Otimização de Experimentos, 2nd ed., Editora da Universidade Estadual de Campinas-SP, 1996.

[9] Royer JC, Nakas JP. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. Enzyme Microbiol Technol 1998;11:405–10.

[10] Purkarthofer H, Sinner M, Steiner W. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimization of production in submerged and solid-state culture. Enzyme Microbiol Technol 1993;15:677–82.

[11] Adamsen AK, Lindhagen J, Ahring BK. Optimization of extracellular xylanase production by *Dictyoglomus* sp. B1 in continuous culture. Appl Microbiol Biotechnol 1995;44:327–32.

[12] Haltrich D, Preiss M, Steiner W. Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*. Enzyme Microbiol Technol 1993;15:854–60.

[13] Hamsaveni DR, Prapulla SG, Divakar S. Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. Process Biochem 2001;36:1103–9.

[14] Silva CJSM, Roberto IC. Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology. Process Biochem 2001;36:1119–24.

[15] Haltrich D, Laussamayer B, Steiner W, Nidetzky B, Kulbe KD. Cellulolytic and hemicellulolytic enzymes of *Sclerotium rolfsii* – optimization of the culture medium and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. Bioresource Technol 1994;50(1):43–50.

[16] Narang S, Sahai V, Bisaria VS. Optimization of xylanase production by *Melanocarpus albomyces* IIS68 in solid state fermentation using response surface methodology. J Biosc Bioeng 2001;91(4):425–7.

[17] Ridder ER, Nokes SE, Knutson BL. Optimization of solid state fermentation parameters for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran. Trans ASAE 1998;41(5):1453–9.

[18] Ridder ER, Nokes SE, Knutson BL. Optimization of solid-state fermentation for the production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on wheat bran in a forced aeration system. Trans ASAE 1999;42(6):1785–90.

[19] Pham PL, Taillandier P, Delmas M, Strehaiano P. Optimization of a culture medium for xylanase production by *Bacillus* sp. Using statistical experimental designs. W J Microbiol Biotechnol 1998;14:185–90.

[20] Subramaniyan S, Prema P. Optimization of cultural parameters for the synthesis of endo-xylanases from *Bacillus* SSP-34. J Scientific Ind Res 1998;57:611–6.

[21] Horikosha K. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Agr Biol Chem 1971;35(11):1783–91.

[22] Miller GL. Use of dinitrossalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal Chem 1959;31:426–8.

[23] Brodel B, Samain E, Debeire P. Regulation and optimization of xylanase production in *Clostridium thermolacticum*. Biotechnol Lett 1990;12(1):65–70.

[24] Subramaniyan S, Prema P. Optimization of cultural parameters for the synthesis of endo-xylanases from *Bacillus* SSP-34. J Scientific Ind Res 1998;57:611–6.

World Journal of Microbiology & Biotechnology 19: 139–144, 2003.
© 2003 *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.*

Application of crude xylanase from *Bacillus licheniformis* 77-2 to the bleaching of eucalyptus Kraft pulp

V.B. Damiano, D.A. Bocchini, E. Gomes and R. Da Silva*
Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, IBILCE, UNESP, R. Cristovao Colombo, n. 2265, S.J. Rio Preto – SP, CEP 15054-000, Brazil
**Author for correspondence: E-mail: dasilva@qeg.ibilce.unesp.br*

Received 9 April 2002; accepted 18 October 2002

Keywords: *Bacillus licheniformis*, biobleaching, Kraft pulp, xylanase

Summary

Alkalophilic *Bacillus licheniformis* 77-2 produced an extracellular alkali-tolerant xylanase with negligible cellulase activity in medium containing corn straw. The effectiveness of crude xylanase on treatment of eucalyptus Kraft pulp was evaluated. A biobleaching experiment was carried out to compare the chlorine saving with pulp treated and untreated by the enzyme. Two-stage bleaching was employed, using a ClO_2 chlorination and NaOH extraction (DE sequence). With the enzymatic treatment, in order to obtain the same value of Kappa number and brightness, respectively 28.5 and 30% less ClO_2 was required in comparison to the enzymatically untreated samples.

Introduction

Xylan is the major constituent of hemicellulose, which is found in association with cellulose and lignin in plant biomass. Endo-xylanases (E.C. 3.2.1.8) are a group of enzymes that catalyse the hydrolysis of xylans. Xylanase has potential applications in food industries (Biely 1985; Beck & Scoot 1994; Classen 1996), but its greatest potential is in the field of biopulping and bleaching of Kraft pulp in the pulp and paper industry (Viikari *et al.* 1986; Kulkarni *et al.* 1999; Beg *et al.* 2001).

Wood is composed mainly of lignin, hemicellulose and cellulose fractions. In the transformation of wood to paper, the lignin fraction must be eliminated. This occurs in two stages: the Kraft process and bleaching. The Kraft process consists of cooking the wood chips at high temperatures and at alkaline pH. In this process, a brown pulp is obtained with a residual lignin, which will be eliminated in the subsequent bleaching process. Most paper industries have used a bleaching sequence based on chlorine dioxide (ClO_2) and extraction by alkaline solutions. The ClO_2 provides an excellent bleaching for the pulp, and although it is significantly less dangerous to the environment than Cl_2 gas, it still causes the formation of absorbable organic halogen (AOX) (Axegard & Renberg 1989). In spite of this, the pulp and paper industries are still facing environmental and legislative pressures to find alternative technologies, in order to reduce the environmental impact of mill effluents (Kulkarni & Rao 1996; Dhillon *et al.* 2000).

At the end of the Kraft stage, when the pH decreases below 13, xylan is reprecipitated on the fibre surface containing the lignin and cellulose, forming a barrier against the extraction of lignin. Since Viikari *et al.* (1986) first demonstrated that the use of xylanases can reduce chlorine bleaching requirements, many independent reports have confirmed this fact by using xylanases from different microorganisms (Kulkarni *et al.* 1999; Beg *et al.* 2001), some of them belonging to *Bacillus* genus (Paice *et al.* 1988; Tremblay & Archibald 1993; Khanongnuch *et al.* 1999; Dhillon *et al.* 2000). The use of this enzyme in the pulp and paper industry has become an alternative for bleaching technology, aimed at the reduction of chlorine in bleaching and consequently resulting in a reduction of chloroorganic compounds in the effluent.

Xylanase bleaching is due to the cleavage of bonds between lignin and carbohydrate and the opening of the pulp structure (Paice *et al.* 1988), making the pulp more permeable for the bleaching chemicals, and facilitating the subsequent removal of lignin and increasing the brightness.

Despite the fact that the use of xylanase has become well established technology, including reports of its application for pulp pretreatment in some paper mills and being the subject of a large number of scientific papers, its use on a large scale in the paper industry worldwide still faces problems, mainly due to the cost (Dhillon *et al.* 2000) and some properties of the enzymes (Garg *et al.* 1998; Kulkarni *et al.* 1999). Considerable progress has to be made with regard to xylanase yields and large-scale availability of xylanase for it to be used routinely in existing conditions in the industrial pulping medium (Lundgren *et al.* 1994; Kulkarni & Rao 1996).

To overcome this, many xylanases from different organisms have been evaluated for their efficiency on pulp delignification and bleach boosting (Kulkarni *et al.* 1999; Beg *et al.* 2000).

Although many studies have been carried out on the detection of xylanase in different microorganisms, few reports have described xylanases from *Bacillus licheniformis* (Archana & Satyanarayan 1997) and no report on the bleaching of eucalyptus Kraft pulp by the use of alkalophilic *Bacillus licheniformis* exists.

In a previous communication we have described an alkalophilic *Bacillus licheniformis* 77-2 that was isolated from decaying wood and selected for its high production of cellulase-free xylanase. This xylanase was thermostable and resistant at alkaline pH (Tavares *et al.* 1997). Therefore, it was of interest to study the production of xylanase on low-cost agricultural residues and evaluate its potential for biobleaching process.

Materials and methods

Chemicals

The Eucalyptus Kraft pulp used in this study was supplied by 'Champion Paper and Cellulose Ltd.', Mogi Guacu, SP – Brazil, which had an initial Kappa number of 15.1, viscosity of 27.9 cP and brightness of 32.9 ISO. Birchwood xylan was purchased from Sigma (St Louis, USA). Eucalyptus xylan was isolated from eucalyptus sawdust as described by Biely (1985). All the other chemicals used were analytical grade and purchased either from Sigma (St Louis, USA), Merck (Darmstadt, Germany) or Synth (Diadema, Brazil).

Microorganism and growth conditions

Bacillus licheniformis 77-2 isolated from decaying wood (Tavares *et al.* 1997) was identified by 'Fundacao Andre Tosello', Campinas – SP, Brazil. The bacterium was grown in alkaline medium, pH 9.0 containing 1% beef extract powder, 1% peptone, 1% NaCl, 0.1% KH_2PO_4, 0.5% Na_2CO_3 (separately sterilized), 2% carbon source. Twenty milliliter of the medium, in 125 ml Erlenmeyer flasks, were inoculated with 1 ml (10^7 cells, calculated from a curve of absorbance × number of cells, previously determined) of a 16 h-old seed culture, and incubated at 50 °C with shaking at 150 rev/min. After 48 h the bacteria were harvested by centrifugation at 10,000 × *g* at 4 °C for 20 min. The cell-free supernatant was used as crude enzyme solution.

To determine the growth curve and enzyme production of *Bacillus licheniformis* 77-2 at 24 h intervals, duplicate experiments were conducted and the contents of two flasks were centrifuged and the enzymatic activities (xylanase, CMCase and Avicelase) were determined in the cell-free supernatants of each flask. The growth on corn straw was indirectly estimated by determination of the cell protein in washed precipitated biomass using the Lowry method.

To optimize the enzyme production, experiments on different carbon sources, agricultural residues such as corncob, cornstarch, corn straw, eucalyptus brown pulp, eucalyptus sawdust and orange bagasse (a fibrous residue of orange peel left over after the extraction of the juice from the orange fruit) were examined. All the agricultural residues were powdered to a diameter of 1.0 mm. Other carbon sources such as sucrose, xylose, eucalyptus xylan, birchwood xylan, and glucose were also used. After 48 h of cultivation the bacterium was harvested by centrifugation at 10,000 × *g* at 4 °C for 20 min and the free cell solution was assayed for enzymatic activity.

Enzyme assays

Enzyme activities were expressed in international units (IU). The activities of xylanase (1,4-β-D-xylan xylanohydrolase, E.C. 3.2.1.8), carboxymethylcellulase or CMCase (endo-1,4-β-D-glucan glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.4) and Avicelase (exo-1,4-β-D-cellobiohydrolase, E.C. 3.2.1.91) were assayed by incubating 0.1 ml of appropriately diluted enzyme (to make sure the activity is initial rate) with 0.9 ml of a suspension containing 0.5% of the respective substrate, xylan (Birchwood – Sigma), carboxymethylcellulose (Sigma-C5678) and Avicel (Merck), in 0.1 M acetate buffer, pH 5.5. After incubation at 60 °C for 10 min the reducing substances released were assayed by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller 1959). The reaction mixture with Avicel was filtered before measurement. Controls were prepared with enzyme added after boiling. One IU of activity toward the substrate mentioned above was defined as 1 μmol of xylose or glucose equivalent released per min under the above assay conditions, by using a xylose or glucose standard curve.

Experiments on chlorine reduction

Pulps were enzyme treated at the optimum conditions previously determined (Tavares 1997): 14 IU of xylanase per g of dry pulp at 4% consistency, pH 6.0, 60 °C, and for 4 h. Control pulps were treated with inactivated enzyme (boiled for 20 min). All the experiments were conducted in a plastic bag. After enzyme treatment the pulp was washed with distilled water, filtered and suction-dried to about 25% consistency. When not used immediately it was stored in a plastic bag and frozen for later chemical bleaching. Two-stage bleaching was employed, using a ClO_2 chlorination and NaOH extraction (DE sequence). It was carried out with a 10% consistency pulp at various charges of ClO_2 per 10 g of pulp at 60 °C for 30 min (Dence & Reeve 1996). The percentage of chlorine used in the bleaching process was calculated from the brown pulp Kappa number (the ml of 0.1 N potassium permanganate consumed by 1 g of dry wood chemical pulp under specific conditions). It

represents the content of residual lignin in the brown pulp and correlates well with pulp bleachability. The dosage of chlorine depends on the required Kappa factor or chlorine multiple (usually 0.14 0.28, as it increases, the active chlorine usage also increases). The Kappa factor (Dence & Reeve 1996) is a standard quantity, determined experimentally, that represents the percentage of active chlorine divided by the Kappa number of the pulp (% of ClO_2 Kappa number = Kappa factor). The extraction was carried out at the same consistency pulp with 1.6% NaOH, at 70 °C for 1 h. Experiments were carried out with two replicates. After the bleaching experiments, the pulp samples were washed with distilled water, filtered and suction-dried, and stored in a plastic bag for later determination of the Kappa number and viscosity. For the determination of brightness, handsheets were prepared under standardized pressure and air dried in a room with standardized light, humidity and temperature, following TAPPI recommendations.

Pulp properties

The investigation of pulp properties was carried out according to TAPPI (Technical Association of Pulp and Paper Industry) Standard Methods. The Kappa number was determined by the reaction of pulp samples with acidified potassium permanganate (TAPPI Protocol. T-236 OM-85). The viscosity evaluation was carried out by dissolving pulps in cupriethylenediamine and by measuring the viscosity with an Ostwald viscometer (TAPPI Protocol, T-230 OM-82). The brightness of the paper sheet was measured by reflectance at 457 nm with an Elrepho 2000 instrument, according TAPPI Protocol, T-452 OM-87.

Results and discussion

Growth and enzyme production

For determining the time course of xylanase production, *Bacillus licheniformis* 77-2 was cultivated in a submerged low-cost medium using 2% corn straw as the carbon source at 50 °C. The bacterial growth increased up to 48 h with a maximum biomass of 2.5 mg ml. The xylanase production increased rapidly from 24 up to 48 h with a maximum xylanase yield of 41 IU ml. Maximum cell biomass and xylanase activity were reached by 48 h, and then both started to decline. In this regard, our result was different from the one reported by Dhillon *et al.* (2000) for *B. circulans*, where an increase in biomass and xylanase were observed after 96 and 72 h, respectively. The fast decreases in both xylanase activity and biomass were surprising, and microscopic observation of the fermented broth (Reys *et al.* 2000) indicated autolysis. This is not an unusual phenomenon (Bailley & Ollis 1986). The population diminishes as a consequence of random lethal events that occur in the culture (Bailley & Ollis 1986). Cellular fragmentation is common in death phase, leading to a release of intracellular material, including protease, into the fermentation broth. Papagianni & Young (2002) have reported an increase in protease along with the fall in biomass concentration. Although we did not measure protease, it would be reasonable to presume its presence in the fermentation medium, as *B. licheniformis* is protease-producing (Kumar & Takagi 1999). However, this will be clarified later. The CMCase and Avicelase activities were negligible under these conditions of enzyme production (Figure 1).

Production of enzymes on various carbons sources

The production of enzymes by *Bacillus licheniformis* 77-2 was completely different depending on the substrates used as carbon sources (Table 1). Xylanase activity was higher when the strain grew on birchwood xylans (46.47 IU/mg) followed by growing on corn straw (42.27 IU/ml). Compared with other reports, this strain produced activity higher than many *Bacillus* species described (Esteban *et al.* 1992; Duarte *et al.* 2000) and a similar level of xylanase activity of *Bacillus* sp. (Yang *et al.* 1995), *Bacillus* sp. AR-009 (Gessesse 1998) and *Bacillus circulans* AB 16 (Dhillon *et al.* 2000), stated to be the highest xylanases activities reported to date. The growth of *B. licheniformis* 77-2 on simple sugars (glucose, sucrose and xylose) resulted in low extracellular xylanase activity. Similar results have been reported for other *Bacillus* species (Esteban *et al.* 1992; Nakamura *et al.* 1993; Dhillon *et al.* 2000). On the other hand, the use of agricultural residues rich in hemicellulose increased xylanase production, similarly to other reported studies (Esteban *et al.* 1992; Nakamura *et al.*

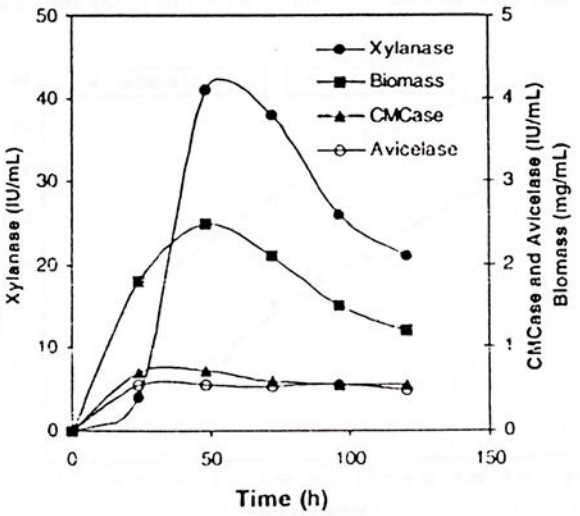


Figure 1 Time course of enzyme production. *Bacillus licheniformis* 77-2 grown on corn straw, at 24 h intervals the contents of two flasks were centrifuged and the enzymatic activities were determined in the cell-free supernatants of each flask. The growth was estimated by determination of the cell protein.

Table 1. Xylanase production by *B. licheniformis* 77-2 on various carbons sources.

Carbon source	Xylanase (IU/ml)	CMCase (IU/ml)	Avicelase (IU/ml)
Birchwood xylan	46.47	0.55	0.51
Corn cob	20.18	0.55	0.45
Corn starch	1.97	0.55	0.44
Corn straw	42.27	0.55	0.56
Eucalyptus brown pulp	16.37	0.55	0.56
Eucalyptus Sawdust	0.98	0.55	0.48
Eucalyptus xylan	29.15	0.55	0.47
Glucose	1.61	0.56	0.52
Orange bagasse	30.24	0.55	0.49
Sucrose	1.48	0.56	0.52
Xylose	1.95	0.55	0.53

Bacillus licheniformis 77-2 grown on indicated substrates. After 48 h of cultivation the bacterium was harvested and the contents of two flasks were centrifuged and the enzymatic activities were determined in the cell-free supernatants of each flask.
The values of enzyme activity (IU/mL) are average of two replicates at 48 h.

1993; Archana & Satyanarayan 1997; Dhillon *et al.* 2000). Negligible xylanase activity was observed when corn starch was used as the substrate.

Activity of CMCase and Avicelase were negligible for all carbon sources tested. The use of crude cellulase-free xylanase is advantageous since it can be applied in the biobleaching processes without requiring purification. Contaminating cellulase in xylanase preparation can, under certain conditions, result in a reduction of fibre strength (Da-Silva *et al.* 1994). Xylan and corn straw were much better than any other substrate. Based on the difference of price, corn straw was preferred for the production of the enzyme.

Biobleaching

Figures 2 and 3 present data obtained on pulp treated and not treated with enzyme and submitted to the bleaching experiments. The kappa factor was used for express the different charges of chlorine active (calculated in ClO_2) used. The lower is the kappa factor, the lower is the charge of chlorine emissions (as measured by adsorbable organic halide, AOX) in the D and E stages (Russomanno 1998). Xylanase treatment led to a decrease in Kappa number and an increase in brightness after the extraction stage. For instance, by fixing the Kappa factor at 0.20 (Figure 2), we observed a reduction of about 1.5 units in the Kappa number (4.5 for the untreated pulp against 3.0 for the enzyme-treated pulp) and an increase of about 5.0 units (Figure 3) in the brightness (64.5 for the untreated pulp against 59.5 for the enzyme-treated pulp).

According to Figure 2, when the kappa factor (concentration of chlorine) increases, the Kappa number of the pulp treated with the enzyme decreased almost linearly until 3.0 units and then, it slowed down and tended to stabilize at 2.0 units.

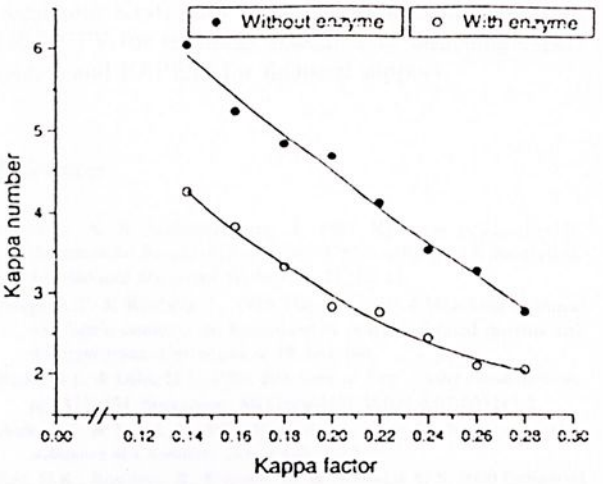


Figure 2. Effect of chlorine concentration on Kappa number of the enzyme-treated and untreated Kraft pulp. Conditions were 14 IU of xylanase per g of dry pulp at 4% consistency, pH 6.0, for 4 h at 60 °C. Control pulps were treated with inactivated enzyme. Bleaching was the DE sequence. All the experiments were conducted in duplicate.

In this work we were mainly interested in evaluating the efficiency of lignin removal by the *B. licheniformis* xylanase 77-2, by comparison of the charge of chlorine reduction in treated and untreated Kraft pulp. Thus, one non-conventional bleaching sequence DE, under typical conditions of Kappa factor (0.14–0.28) and 1.6% NaOH extraction, was followed after enzyme treatment. This bleaching sequence, without enzyme treatment, may result in brightness around of 55-65 ISO and Kappa number around of 4.0–5.0 instead of the conventional DED that results in brightness and Kappa numbers around 85–90 and 2.0–3.0, respectively. However, various bleaching studies have shown that a very fast delignification reaction and the majority of the bleaching occur in the initial chlorine dioxide stage (D).

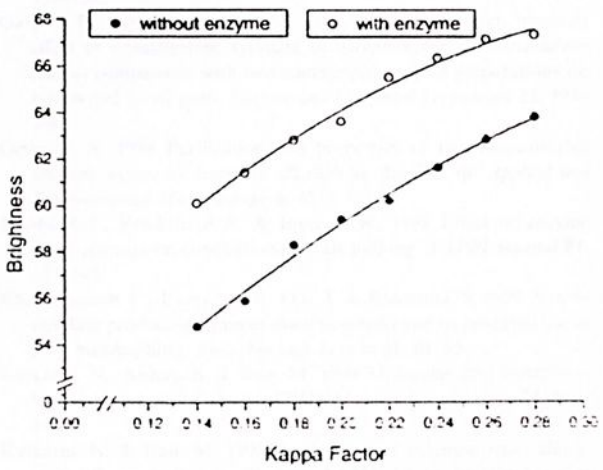


Figure 3. Effect of chlorine concentration on Brightness of the enzyme-treated and untreated Kraft pulp. Conditions were 14 IU of xylanase per g of dry pulp at 4% consistency, pH 6.0, for 4 h at 60 °C. Control pulps were treated with inactivated enzyme. Bleaching was the DE sequence. All the experiments were conducted in duplicate.

An 1-min retention time, with a 0.25 kappa factor, achieved 84% delignification of a 30-min stage (Russomanno 1998). Jacobs *et al.* (1998) have reported an increase in brightness of enzyme-treated pulp from 52 to 75–83 ISO (depending on the charge of ClO_2 used), after DE and DED, respectively. It is possible that the economy achieved in the two-stage bleaching may not be maintained in the three-stage process, however the economy achieved after DE is a good indicator of the effectiveness of the enzyme (personal information from Dr Jorge Colodette).

The enzyme treatment of the Kraft pulp resulted in a significant reduction in chlorine consumption and achieved the same parameters of delignification and brightness. For instance, for a target Kappa number of 3.0, the required Kappa factor would be 0.20 (0.286 g ClO_2/10 g of dry pulp) for pulps submitted to the enzymatic treatment. On the other hand, to obtain the same value of Kappa number in the control pulp, a Kappa factor of 0.28 (0.4 g ClO_2/10 g of dry pulp) would be necessary. This difference represents a 28.5% decrease in the rate of the ClO_2 used for pulp delignification.

Compared to the control, the pulp treated with enzyme was brighter than control after the DE treatment stages (Figure 3). The use of enzyme represented an average increase of 5.0 units on the brightness. Our results indicated that, for a given brightness value, e.g. of 63, a 0.26 Kappa factor (0.37 g ClO_2/10 g of dry pulp) would be necessary for the untreated pulp, against 0.18 (0.26 g ClO_2/10 g of dry pulp) for the enzymatically treated pulp. This is about 30% less consumption of chlorine dioxide, necessary to reach this brightness ceiling. Other authors have reported reductions of chlorine dioxide in a range of 20–40% (Beg *et al.* 2001), when the pulp was treated with xylanase. In despite of knowing the differences in enzyme charge, condition of treatment and type of pulp used in our work regarding to published results, we cannot make a direct comparison with that data. However, despite the two-stage bleaching, and also the differences named above, it is reasonable to assume that our result is a good indicator that *B. licheniformis* xylanase 77-2 is efficient for chlorine reduction in biobleaching.

In conclusion, in this study we have shown that *B. licheniformis* 77-2 xylanase might be considered to belong to the wide group of enzymes able to be used as bleaching boosting agent, and decreasing bleaching chemical requirements. The possibility of producing crude cellulase-free xylanases from untreated agricultural wastes has also been demonstrated in this study, and it may be effective in improving the economy of enzyme production for biobleaching.

Acknowledgements

The authors are thankful to Champion Paper and Cellulose Ltd., Mogi Guaçu, SP, Brazil for donating the eucalyptus Kraft pulp, to Dr Jorge Luis Colodette from DEF-UFV for technical assistance in bleaching experiments and FAPESP for financial support.

References

Archana, A. & Satyanarayana, T. 1997 Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A 99 in solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* **21**, 12–17.

Axegerd, P. & Renberg, L. 1989 The influence of bleaching chemical and lignin contents on formation of polychlorinated dioxins and dibenzofurans. *Chemosphere* **19**, 661–668.

Bailey, J.E. & Ollis, D.F. 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*, pp. 373–454. Singapore: McGraw-Hill. ISBN 0-07-003212-2.

Beek, C.J. & Scoot, D. 1994 Enzymes in foods for better or worse. *Advances in Chemistry Series* **138**, 1–17.

Beg, Q.K., Bhushan, B., Kapoor, M. & Hoondal, G.S. 2000 Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus Kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology* **27**, 459–466.

Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L. & Hoondal, G.S. 2001 Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**, 326–338.

Biely, P. 1985 Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology* **3**, 288–290.

Classen, H.L. 1996 Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. *Animal Feed Science and Technology* **62**, 21–27.

Da-Silva, R., Yim, D.K. & Park, Y.K. 1994 Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp for pulp improvement. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **77**, 109–111.

Dence, C.W. & Reeve, D.W. 1996 *Pulp Bleaching - Principles and Practice*, pp. 213–443. Atlanta, GA, USA: TAPPI PRESS., ISBN 0-89852-063-0.

Dhillon, A., Gupta, J.K., Jauhari, B.M. & Khanna, S.A. 2000 Cellulase-poor, thermostable, alkalitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. *Bioresource Technology* **73**, 273–277.

Duarte, M.C.T., Pellegrino, A.C.A., Portugal, E.P., Ponezi, A.N. & Franco, T.T. 2000 Characterization of alkaline xylanase from *Bacillus pumillus*. *Brazilian Journal of Microbiology* **31**, 90–94.

Esteban, R., Villanueva, J.R. & Villa, T.G. 1992 L-D-Xylanases of *Bacillus circulans* WL-12. *Canadian Journal of Microbiology* **28**, 733–793.

Garg, A.P., Roberts, J.C. & McCarthy, A.J. 1998 Bleach boosting effect of cellulase-free xylanase of *Streptomyces thermoviolaceus* and its comparison with two commercial enzyme preparations on birchwood Kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology* **22**, 594–598.

Gessesse, A. 1998 Purification and properties of two thermostable alkaline xylanases from an alkaliphilic *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **4**, 3533–3535.

Jacobs, C.J., Venditti, R.A. & Joyce, T.W. 1998 Effect of enzyme pretreatments on conventional Kraft pulping. *TAPPI Journal* **81**, 143–147.

Khanongnuch, C., Lumyong, S., Ooi, T. & Kinoshita, S. 1999 A non-cellulase producing strain of *Bacillus subtilis* and its potential use in pulp biobleaching. *Biotechnology Letters* **21**, 61–63.

Kulkarni, N., Abhay, S. & Rao, M. 1999 Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* **23**, 411–456.

Kulkarni, N. & Rao, M. 1996 Application of xylanase from alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp. NCIM 59 in biobleaching of bagasse pulp. *Journal of Biotechnology* **51**, 167–173.

Kumar, C.G. & Takagi, H. 1999 Microbial alkaline protease: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances* **17**, 561–594.

Lundgren, K.R., Bergkvist, I., Hogman, S., Joves, H., Eriksson, G., Bartfai, T., Laan, J., Rosenberg, F. & Shoham, Y. 1994 TCF mill

trial on soft wood pulp with Korsnäs thermostable and alkaline stable xylanase T6. *FEMS Microbiology Reviews* 13, 365–368.

Miller, G.L. 1959 Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31, 426–428.

Nakamura, S., Wakabashi, K., Nakai, R., Aono, R. & Horikoshi, K. 1993 Production of alkaline xylanase by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 41-M-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 9, 221–224.

Paice, M.G., Bernier, R. Jr. & Jurasek, L. 1988 Viscosity enhancing bleaching of hardwood Kraft pulp with xylanase from a cloned gene. *Biotechnology and Bioengineering* 32, 235–239.

Papagianni, M. & Moo-Young, M. 2002 Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. *Process Biochemistry* 37, 1271–1278.

Reys, G.F., Corbett, D., Benz, F.W. & Doyle, R.J. 2000 Acrylonitrile induces autolysis *Bacillus subtilis*. *FEM Microbiology Letters* 182, 255–258.

Russomanno, C. 1998 Bleach plant capital reduction with rapid bleaching and simplified [D E/D] stages. Project fact sheet, Forest Products. Office of Industrial Technologies, Energy Efficiency and Renewable Energy US Department of Energy Washington, DC 20585. http:// www.oit.doe.gov.

Tavares, V.B., Gomes, E. & Da-Silva, R. 1997 Characterization of a cellulase-free xylanase producing *Bacillus* sp. for biobleaching of Kraft pulp. *Brazilian Journal of Microbiology* 28, 179–182.

Tavares, V.B. 1997 Production, characterization and application of xylanase to the bleaching process of eucalyptus Kraft pulp. Ms. Dissertation. Bioscience Institute – UNESP, Rio Claro – SP, Brazil.

Tremblay, L. & Archibald, F. 1993 Production of a cloned xylanase in *Bacillus cereus* and its performance in Kraft pulp prebleaching. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 853–860.

Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Sundquist, J. & Linko, M. 1986 Bleaching with enzymes. *Proceedings of the 3rd International Conference of Biotechnology on Pulp and Paper Industry*. Stockholm, June 16–19, pp. 67–69.

Yang, V.W., Zhaung, Z., Elegir, G. & Jeffries, T.W. 1995 Alkaline active xylanase produced by an alkaliphilic *Bacillus* sp. Isolated from Kraft pulp. *Journal of Industrial Microbiology* 15, 434–441.

BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY

Seleção de Microrganismos Produtores de Ciclodextrina Glicosiltransferase (CGTase), Produção e Caracterização da Enzima

The Selection of Cyclodextrin Glycosyltransferase (CGTase) Producing Microorganisms and the Production and Description of this Enzyme

AUTORES
AUTHORS

Heloiza Ferreira Alves PRADO
Eduardo HILÁRIO
Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada
Departamento de Química e Geociências, UNESP
Rua Cristóvão Colombo, 2265
CEP 15054-000 São José do Rio Preto, SP

Eleni GOMES
Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada
Departamento de Biologia – UNESP
Rua Cristóvão Colombo, 2265
CEP 15054-000 São José do Rio Preto, SP

✉ **Roberto DASILVA**
Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada
Departamento de Química e Geociências, UNESP
Rua Cristóvão Colombo, 2265
CEP 15054-000 São José do Rio Preto, SP
e-mail: dasilva@qeg.ibilce.unesp.br

RESUMO

Foram isoladas 80 linhagens de bactérias alcalofílicas, a partir de amostras de solos cultivados com produtos hortifrutícolas. Quatro linhagens apresentaram alta produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase, EC. 2.4.1.19), uma foi identificada como *Bacillus* sp H25 e as demais como *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* que foram denominadas de E16, H27 e H54. A produção de CGTase foi avaliada em fermentação no estado sólido e em fermentação submersa. Nesta última mediu-se também o crescimento celular. A fermentação submersa produziu maiores níveis de CGTase. Na fermentação em estado sólido, as melhores produções de CGTase ocorreram no meio composto de farelo de trigo mais farinha de soja e no meio de farelo de trigo. As características físico-químicas das CGTases foram determinadas. Os pHs ótimos revelaram dois picos, sendo um ácido e outro alcalino. As temperaturas ótimas ficaram entre 60°C e 70°C. A estabilidade térmica foi avaliada entre 35°C e 55°C e a estabilidade ao pH foi avaliada entre 4,5 e 11,0.

SUMMARY

Eighty alkalophilic bacterial strains were isolated from samples of soil which had produced vegetable and fruit crops. Four strains displayed high CGTase activity. One was identified as *Bacillus* sp H25 and the others as *Bacillus* sp subgroup akalophillus which were named E16, H27 and H54. CGTase production was studied in both solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). In the latter case cellular growth was also studied. The production of CGTase in SmF was greater than in SSF. In SSF, greater CGTase production was obtained in the following two mediums : a) wheat bran plus soy bran and b) wheat bran. The physical and chemical characteristics of the CGTase were determined. Optimum pH presented two peaks: one acid and the other alkali. Optimum temperatures were in the 60°C - 70°C range. Thermal stability was in the 35°C - 55°C range, and pH stability was in the 4.5 – 11 range.

PALAVRAS-CHAVE
KEY WORDS

Ciclodextrina glicosiltransferase, CGTase, *Bacillus* sp alcalofílico, Fermentação em estado sólido, Fermentação submersa, Caracterização físico-química / Cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase, Alkalophile *Bacillus* sp, Solid state fermentation, Submerged fermentation, Physicochemical characterization.

Recebido: Em revisão: 06/10/2000 Aprovado: Aceito: 23/05/2002

1. INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas (CDs) são maltooligossacarídeos cíclicos não-redutores com 6 a 13 unidades de glicose (BENDER, 1986, LARSEN *et al.*, 1998) ligadas entre si, por ligações α-1,4-glicosídicas. As ciclodextrinas mais comuns são do tipo α-, β- e γ- CDs contendo 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente. As ciclodextrinas, cujas cavidades internas são hidrofílicas e externamente hidrofóbicas, formam complexos de inclusão com uma variedade de substâncias, mudando as características físicas e químicas da molécula-hóspede. Essa propriedade das CDs tem levado a um aumento em sua aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticos, produtos agroquímicos, química, plásticos e outras (ALLEGRE , DERATANI, 1994, BENDER, 1986, PSZCZOLA, 1988, SHUKLA, 1991, SZEJTLI, 1982, SZEJTLI,1985, SZEJTLI, 1997). A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase; EC 2.4.1.19) é a enzima que converte o amido em ciclodextrinas através das reações de ciclização, acoplamento e desproporcionação (BENDER, 1986, TONKOVA, 1998).

Desde a descoberta da CGTase vários microrganismos foram descritos como produtores da mesma, havendo predomínio do gênero *Bacillus*. Outros gêneros já foram caracterizados como produtores de CGTase entre eles *Micrococcus* sp. ATCC 31606 (STARNES, 1990), *Micrococcus luteus*, *Micrococcus varians* (ABELYAN *et al.*, 1995), *Klebisiella pneumoniae* M5al (BENDER, 1977, VIHINEN, MÄNTSÄLÄ, 1989), *Klebisiella oxytoca* 19-1 (LEE *et al.*, 1992), *Brevibacterium* sp n°9605 (MORI *et al.*, 1994, MORI *et al.*, 1995), entre os termofílicos têm-se *Thermoanaerobacter* sp ATCC 53627 (STARNES, 1990, ZAMOST *et al.*, 1991), *Thermoactinomyces* sp INMIA - A-554 e A-561 (ABELYAN *et al.*, 1995), e *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 (WIND *et al.*, 1995). No Brasil, foram relatados *Bacillus lentus* (SABIONI, PARK, 1992), *Bacillus circulans* n°76 (SALVA *et al.*, 1997) linhagem n°37 e linhagem n°41 (MATIOLI *et al.*, 1998). O fator que mais limita a ampliação do uso industrial das CDs é ainda considerado, o elevado custo de produção das mesmas, devido ao também elevado custo das CGTases usadas no processo. Assim, pesquisas dirigidas à produção das CGTases e/ou CDs de menor custo são importantes para a viabilizar economicamente o uso das CDs em escala comercial. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo isolar novas linhagens produtoras de CGTase a partir de amostras de solos cultivados no Brasil, produzir a enzima em substratos de baixo custo e caracterizar físico-quimicamente a enzima produzida.

2. METODOLOGIA

Isolamento dos microrganismos

Aproximadamente um grama (1g) de solos sombreados e agrícolas como de hortas, culturas de mandioca, milho e batata foi diretamente transferido para frascos contendo 5mL de meio de cultivo. As amostras foram incubadas a 37°C e a 45°C por aproximadamente 24 horas. Em seguida, o material foi inoculado superficialmente, por esgotamento em estrias, em placas de Petri contendo meio seletivo para CGTase. As placas foram incubadas a 37°C e 45°C por períodos de até 144 horas. As colônias, que formaram o halo amarelo contrastante com o meio vermelho (CGTase positivas), foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio inclinado de manutenção.

Meio de seleção

10,0g/L amido solúvel; 5,0g/L peptona; 5,0g/L extrato de levedura; 1,0g/L K_2HPO_4; 0,2g/L $MgSO_4.7H_2O$; 10,0g/L Na_2CO_3*; 0,3g/L fenolftaleína; 0,1g/L alaranjado de metila; 15,0g/L ágar; pH 10,0. (*)esterilizado separadamente e adicionado ao meio após atingir a temperatura 60°C (PARK *et al.*, 1989).

Meio de cultivo

10,0g/L amido solúvel; 5,0g/L peptona; 5,0g/L extrato de levedura; 1,0g/L K_2HPO_4; 0,2g/L $MgSO_4.7H_2O$; 10,0g/L Na_2CO_3; pH 10,0. Para a manutenção das culturas, foi utilizado o meio de cultivo acrescido de 20,0g/L de ágar (NAKAMURA, HORIKOSHI, 1976a, NAKAMURA , HORIKOSHI, 1976b).

Fermentação submersa

Para avaliação da produção de CGTase e do crescimento celular, as linhagens foram inoculadas em erlenmeyers de 125mL, com 20mL de meio de cultivo. Cada erlenmeyer recebeu 0,1mL de uma suspensão celular padronizada para conter $3,2 \times 10^7$ cel./mL, a partir de um pré-inóculo de 24 horas. O crescimento microbiano foi realizado em *shaker* sob agitação de 150rpm, a 37°C em períodos de tempos de até 96 horas. As amostragens foram realizadas em um intervalo inicial de 12 horas e em seguida de 24 horas, até se completarem as 96 horas, sendo retirado o volume total de cada erlenmeyer. O material fermentado foi centrifugado a 10000xg a 5°C por 10 minutos. O sobrenadante livre de células foi utilizado para determinar a atividade da enzima e o precipitado foi utilizado para a quantificação da biomassa microbiana produzida, em uma absorbância de 640nm.

Fermentação em estado sólido

As linhagens foram inoculadas como na fermentação submersa, com a diferença que um inóculo de 0,1mL foi previamente diluído para 2,5ml a fim de melhorar a homogeneização. Os meios estudados foram compostos de: farelo de trigo; farelo de trigo + amido solúvel; farelo de trigo + farinha de arroz; farelo de trigo + batata; farelo de trigo + fubá; farelo de trigo + mandioca; farelo de trigo + farinha de soja e farelo de trigo + farinha de trigo. Os meios

foram preparados em erlenmeyers de 125mL com um total de 5,0g de material sólido. Nos meios com misturas de fontes de carbono foi mantida a proporção de 1:1. Após a adição e homogeneização dos 2,5mL do inóculo, foram adicionados 2,5mL de solução Na_2CO_3 a 1,0%. Nestas condições, a umidade final nos erlenmeyrs no início dos experimentos foi de 60%. Os frascos foram incubados em estufa a 37°C e de acordo com informações da literatura (DIAS *et al.*, 1992, NAKAMURA , HORIKOSHI, 1976a, NAKAMURA , HORIKOSHI, 1976b, RAMAKRISHNA *et al.*, 1994), as amostras da fermentação em meio sólido foram retiradas apenas no tempo de 72 horas. Após o crescimento, detectado visualmente e pelo odor típico da fermentação, a enzima foi extraída pela adição de 20mL de água destilada aos meios sólidos que foram rompidos suavemente com bastão de vidro e, em seguida, mantidos a uma agitação de 100rpm durante uma hora a temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada a vácuo e centrifugada.

Determinação da atividade enzimática

Foram utilizados dois métodos de análise de atividade CGTase porque a formação das CDs envolve a dextrinização e a ciclização. O método com iodo acompanha a dextrinização e o método com fenolftaleína é específico para a ciclodextrina já formada. Como o método dextrinizante é inespecífico, foi determinada, também, a presença de açúcares redutores nas misturas reacionais, a fim de evitar erros de interpretação entre atividade CGTase e atividades de amilases.

Atividade dextrinizante

Foi baseado no descrito por PONGSAWASDI, YAGISAWA (1987), onde 0,1mL da solução enzimática, adequadamente diluída, foi adicionado a 0,3mL de solução de amido solúvel a 0,5% (p/v), em tampão acetato 0,1 M, pH 5,6. Após incubação a 55°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 4,0mL de solução de HCl 0,2 M. Em seguida, o meio reacional recebeu 0,5mL de reativo de Iodo (0,30% de KI e 0,03% de I_2). A mistura de reação foi diluída com 10mL de água destilada. O controle foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se a enzima pelo volume equivalente de água destilada. A absorbância foi determinada a 700nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% a intensidade da cor azul do complexo Iodo-amido por minuto.

Atividade CD-fenolftaleína

Foi baseado no descrito por MÄKELÄ *et al.* (1988) com algumas modificações. Assim, 0,1mL de solução enzimática diluída foi adicionada em 0,8mL de solução de amido solúvel a 1,0% (p/v), em tampão acetato 0,1 M, pH 5,6. Após incubação a 55°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 4,0mL de solução de Na_2CO_3, 0,25 M. Em seguida, foi acrescentado 0,1mL de solução de fenolftaleína a 1mM. O controle recebeu a solução enzimática apenas no momento da leitura. A absorbância foi determinada em 550nm. Uma unidade de atividade enzimática fenolftaleína foi definida como a quantidade de enzima, necessária para produzir 1μmol de β-ciclodextrina, por minuto.

Método do ácido dinitrossalicílico (DNS)

O método DNS foi utilizado para determinar a atividade de amilase sacarificante, através da quantificação do açúcar redutor liberado pela enzima, conforme descrito por MILLER (1959). Assim, 0,1mL da enzima foi adicionado a 0,9mL de solução de amido solúvel, a 1,0% (p/v), em tampão acetato, 0,1 M, pH 5,6. Após incubação, a 55°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 2,0mL do reagente DNS (ácido dinitrossalicílico). Em seguida, a reação foi incubada por 6 minutos em banho-maria em ebulição. A mistura de reação foi diluída com 10mL de água destilada. O controle recebeu a solução de enzima somente após a adição do reagente DNS. O branco foi preparado conforme o processo descrito, substituindo-se a solução de enzima e o substrato pelo volume equivalente de água destilada. A absorbância foi determinada a 540nm, em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1μmol de glicose, por minuto, sob as condições de reação.

Caracterização físico-química da CGTase

pH ótimo e temperatura ótima: Foram determinados conforme descrito em atividade dextrinizante, exceto que variou-se, respectivamente, o valor de pH ou da temperatura de incubação durante a reação enzimática, conforme indicado nas figuras.

Estabilidade ao pH e temperatura de estabilidade: O efeito desnaturante do pH ou o da temperatura sobre a atividade enzimática foram respectivamente realizados, incubando-se previamente a enzima, sem o substrato, em soluções de diferentes valores de pH por 24 horas à temperatura ambiente ou em diferentes valores de temperaturas (pH 6,0) por uma hora. A atividade enzimática residual foi avaliada conforme descrito em atividade dextrinizante.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento dos microrganismos

Foram isoladas 80 linhagens de bactérias alcalofílicas que apresentaram atividade de CGTase. Destas linhagens, 14 apresentaram crescimento a 45°C e as demais cresceram a 37°C. As 4 linhagens com melhores produções de CGTase foram mesófilas e estão listadas na Tabela 1. Elas foram identificadas pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" - Campinas, SP e apresentaram características do gênero *Bacillus*, sendo que as linhagens E16, H27 e H54 estão incluídas no subgrupo *alcalophilus*.

TABELA 1. Produção de CGTase e origem das linhagens selecionadas

Linhagens	E16	H27	H25	H54
Cultivo do solo	Banana	Coentro (horta)	Batatinha	Mandioca
Ativ. Dextrinizante	121,0	71,0	65,0	71,0
Ativ. Fenolftaleína	7,0	7,0	5,5	6,5
Ativ. Amilase	0,6	0,9	0,6	0,6

Atividades expressas em U/mL, após 60 horas de cultivo.

Produção de CGTase

Os dados de atividade CGTase obtidos nos dois métodos empregados e a muito baixa presença de açúcares redutores nas misturas de reações confirmaram a produção de CGTase pelas linhagens estudadas.

Nas condições dos experimentos, a fermentação submersa foi a que apresentou os maiores níveis de produção da CGTase (Tabelas 1 e 2). O meio líquido utilizado (NAKAMURA, HORIKOSHI, 1976a, NAKAMURA, HORIKOSHI, 1976b) é rico e completo. As fontes de nitrogênio empregadas foram de origem orgânica, uma vez que a literatura indica a necessidade de nitrogênio originado de fontes orgânicas para a produção de CGTase por *Bacillus* (TONKOVA, 1998). A relação C:N foi de 40:12, adequada para não inibir o crescimento nem induzir alterações de ordem fisiológica na performance bacteriana (BAILEY, OLLIS, 1986).

As produções de CGTase medidas pelo método dextrinizante foram maiores em 48 horas, exceto para o *Bacillus* sp H25. O método CD-fenolftaleína mostrou uma produção maior em 48 horas para os *Bacillus* sp E16 e H27, e em 72 horas para o *Bacillus* sp H54 e H25 (Tabela 2). Esses resultados mostram que o pico de produção varia de microrganismo para microrganismo. Entretanto, foi mantido um nível elevado de atividade após 24 horas de cultivo, com pequenas flutuações no período de até 72 horas de cultivo (Tabela 2). Geralmente, nas espécies de *Bacillus* descritas na literatura, a produção enzimática ocorre entre 40 e 50 horas de fermentação (TONKOVA, 1998), o que está de acordo com os resultados obtidos. A interpretação dos resultados dos dois métodos mostra que as CGTases dos diferentes microrganismos podem responder diferentemente quanto à velocidade de dextrinização e de formação das ciclodextrinas. Diferenças de atividades enzimáticas observadas entre os resultados das Tabelas 1 e 2 estão razoavelmente dentro da faixa de erros experimentais observados neste tipo de experimento.

A produção da enzima acompanhou a fase de crescimento exponencial ocorrido nas primeiras 24 horas. Após este período, a taxa de produção diminuiu e o nível de atividade medido pelo método CD-fenolftaleína tendeu a se estabilizar ao redor de 48 horas de cultivo, coincidindo com a fase de crescimento estacionário. Verificaram-se algumas flutuações nos níveis de atividade, as quais são geralmente esperadas, por estar dentro da margem de erro, para este tipo de experimento. *Em Bacillus cereus* e outras espécies de *Bacillus* alcalofílicos (JAMUNA *et al.*, 1993, NAKAMURA, HORIKOSHI, 1976a, NAKAMURA, HORIKOSHI, 1976b) também foi relatada a produção de CGTase na fase exponencial, sendo que em *B. cereus* deu-se entre 16-20 horas de fermentação, provavelmente devido à alta concentração do inóculo utilizado (5%) (JAMUNA *et al.*, 1993).

É conhecido que nas formulações de meios de culturas o uso das tradicionais fontes de carbono (C) e nitrogênio (N) comerciais acarreta um custo consideravelmente elevado na produção industrial de enzimas (BAILEY, OLLIS, 1986, DAMASO *et al.* 2000, DIAS *et al.*, 1992). Assim, pesquisas dirigidas à produção de enzimas, utilizando resíduos das agroindústrias de baixo custo, visando à substituição das fontes convencionais de C e N, são importantes para a viabilizar economicamente o uso das enzimas em escala comercial (DAMASO *et al.*, 2000). Alguns substratos de baixo custo e fácil obtenção foram testados na formulação de um meio sólido de produção de CGTase, como alternativa a um dos meios reconhecidamente de maior produção da CGTase descrito na literatura (NAKAMURA, HORIKOSHI, 1976a, NAKAMURA, HORIKOSHI, 1976b, PARK *et al.*, 1989), porém de custo alto.

TABELA 2. Produção de CGTase em fermentação submersa.

	Ativ. Dextrinizante (U/mL)					Ativ. CD-Fenolftaleína (U/mL)			
	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
E16	20,3	98,0	105,7	87,5	72,2	2,4	4,3	3,0	0,4
H27	12,2	80,5	99,7	89,1	82,5	2,0	4,4	3,8	2,7
H25	17,6	105,5	97,4	84,6	71,2	1,5	2,9	3,5	1,8
H54	22,4	84,6	96,5	86,7	53,7	2,7	3,4	4,4	3,7

As quatro linhagens apresentaram bom crescimento nos meios sólidos. Nesses meios a produção de CGTase foi avaliada somente pela atividade dextrinizante pois, nesses casos, os extratos contêm pigmentos, oriundos principalmente do farelo de trigo, que inviabilizaram as medidas pelo método CD-fenolftaleína. O meio composto por farelo de trigo + farinha de soja foi o que apresentou níveis mais elevados de atividade dextrinizante para as quatro linhagens estudadas. O meio composto de farelo de trigo + mandioca também apresentou atividades altas para as linhagens, exceto para *Bacillus* sp H25. O meio de farelo de trigo sem mistura também apresentou atividade relativamente boa para as linhagens estudadas. As linhagens *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* H27 e *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 apresentaram, ainda, boa atividade com os meios de farelo de trigo + batata, farelo de trigo + fubá e farelo de trigo + amido solúvel (Tabela 3). Destes dados, inferiu-se que alguns dos nutrientes que o farelo de trigo sozinho não pode proporcionar aos microrganismos foram fornecidos pelos componentes a ele associados (farinha de soja, mandioca, batata) no cultivo.

Conforme os resultados apresentados, comparativamente, apenas no meio composto com farelo de trigo e farinha de soja as atividade foram altas para todas as linhagens em estudo, as quais ficaram próximas das obtidas em meio líquido. É interessante observar que entre todas as formulações testadas, a associação entre trigo e soja foi a única com um bom balanço de aminoácidos, o que sugere a importância deste equilíbrio na produção de CGTase por *Bacillus*.

A presença de proteases (não determinada nesta fase do trabalho) deve ser avaliada uma vez que a sua presença pode explicar uma queda da atividade enzimática no meio. Em se confirmando a presença desta enzima, uma redução no tempo de fermentação pode reduzir o declínio da atividade. A presença desta enzima tem sido relatada nos meios ricos fermentados por *Bacillus* (RAMAKRISHIMA *et al.*, 1993).

TABELA 3. Produção de CGTase em meio semi sólido, após 72 horas de cultivo.

Composição do meio	*Bacillus* sp H25	*Bacillus* sp H27	*Bacillus* sp E16	*Bacillus* sp H54
Farelo de trigo	57,8	63,4	72,0	55,2
Farelo + amido solúvel	40,0	56,0	58,2	12,7
Farelo + farinha de arroz	28,6	41,4	32,3	25,2
Farelo + batata	20,3	73,1	60,3	37,9
Farelo + fubá	28,6	70,7	51,6	35,3
Farelo + mandioca	42,1	82,9	64,8	73,5
Farelo + farinha de soja	77,5	70,7	80,5	68,3
Farelo + farinha de trigo	39,6	51,2	47,7	48,1

Atividade medida pelo método dextrinizante (U/mL)

São relatados poucos estudos com a produção de CGTase em meio semi-sólido. RAMAKRISHIMA *et al.* (1993) observaram, em seus estudos, que a fermentação em meio sólido de farelo de trigo produziu atividade de CGTase relativamente maior que em meio líquido. Eles também encontraram decréscimo na atividade CGTase em tempos prolongados de fermentações e sugeriram que este decréscimo seria uma conseqüência da presença de proteases no meio de fermentação.

Embora, a relação C:N seja da maior importância na formulação de um meio de cultura, uma vez que serão convertidos na biomassa e metabolitos, ela não foi quantificada nos experimentos de meio sólido. Todavia, comparativamente aos dados de literatura pode se considerar que os níveis de substratos empregados na fermentação semi-sólida estejam dentro dos exigidos para um desenvolvimento fisiológico normal das linhagens de *Bacillus* estudadas e, desta forma, não limitaram o desenvolvimento celular bem como a síntese da enzima (NAKAMURA, HORIKOSHI, 1976a, NAKAMURA, HORIKOSHI, 1976b).

Caracterização da CGTase

Efeito do pH

As caracterizações das enzimas foram feitas pelo método dextrinizante. Todas as CGTases apresentaram um pico de atividade no pH ácido e outro no pH alcalino, além disto também tiveram reduzida atividade em pHs entre 7,0 e 7,5. O *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* H27 apresentou um pico ótimo em pH 5,5 e outro na faixa de 8,5 a 9,0. Os *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, H54 e *Bacillus* sp H25 apresentaram dois picos ótimos nos pHs 5,5 e 9,0; 6,0 e 8,0; 5,5 e 8,0, respectivamente (Figura 1). Várias outras espécies de *Bacillus* apresentam essa característica para CGTase, isso pode sugerir a presença de duas proteínas com atividades catalíticas distintas ou uma mesma enzima com capacidade de atuação em ampla faixa de pH.

As enzimas produzidas pelos *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, H27 e H54 apresentaram ampla faixa de

estabilidade ao pH apos 24 horas de incubação a 25°C. O *Bacillus* sp H25 apresentou um faixa de estabilidade menor que as demais linhagens como visualizado na Figura 2.

Tendo em vista os resultados obtidos e os observados na literatura, tem-se em comum que na maioria das linhagens estudadas há dois picos de pH ótimo, a linhagem n°37 estudada por MATIOLI *et al.* (1998) apresentou apenas um pico de pH ótimo em pH 8,0 e a linhagem *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* H27 igualmente apresentou apenas um pico de pH ótimo, mas em pH 5,5. A faixa para a estabilidade do pH foi ampla para todas as linhagens estudadas neste trabalho, semelhante à apresentada pelo *Bacillus* sp alcalofílico estudado por NAKAMURA, HORIKOSHI (1976a), que foi de 6,0-10,0, já as linhagens *Bacillus lentus* e *Bacillus circulans* n°76 estudadas por SABIONI, PARK (1992) e SALVA *et al.* (1997) foram menores entre 6,5-8,5 e 6,5-9,0, respectivamente.

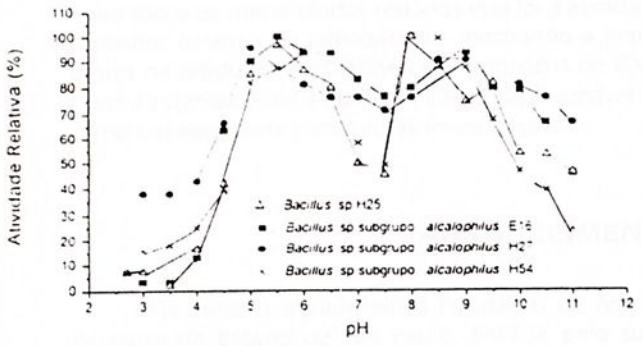


FIGURA 1. Efeito do pH sobre a atividade CGTase. Tampões: acetato de sódio (3,0 - 5,5); fosfato (6,0 - 8,0); glicina-NaOH (8,5 - 11,5) e tampão McIlvaine (2,5 - 7,5).

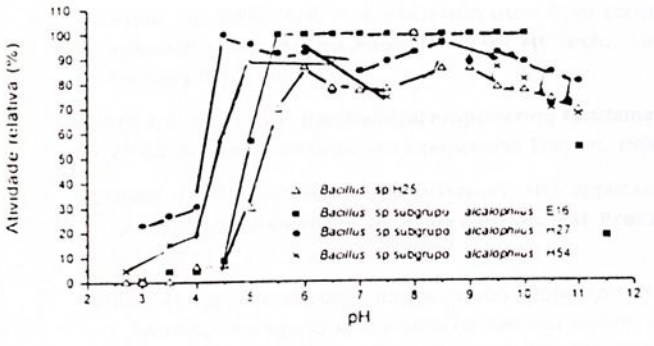


FIGURA 2. Efeito do pH sobre a estabilidade da CGTase. Tampões: acetato de sodio (3,0 - 5,5); fosfato (6,0 - 8,0); glicina-NaOH (8,5 - 11,5) e tampão McIlvaine (2,5 - 7,5).

Efeito da Temperatura

As enzimas produzidas pelos *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, H27, H54 e *Bacillus* sp H25 apresentaram máxima atividade nas temperaturas de 55°C - 60°C, 65°C - 70°C, 60°C - 65°C e 65°C, respectivamente (Figura 3). A atividade residual da enzima, após 60 minutos de incubação às temperaturas de 35°C - 75°C, foi de 100% até as temperaturas de 35°C para *Bacillus* sp H25 e de 55°C, 50°C e 40°C para *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16, H27 e H54 (Figura 4).

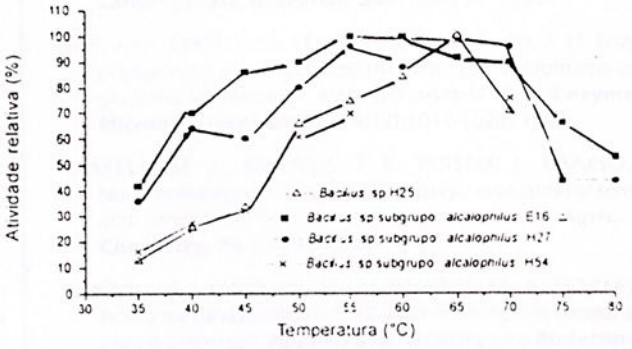


FIGURA 3. Efeito da temperatura sobre a atividade CGTase.

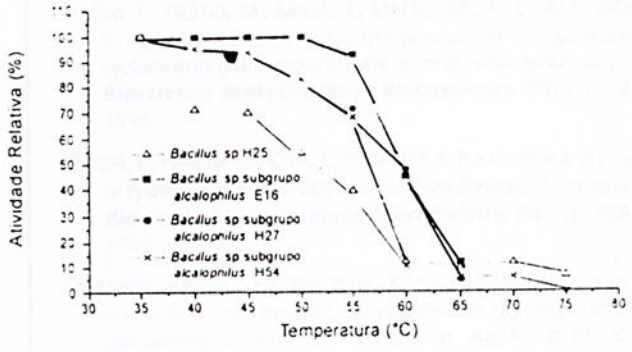


FIGURA 4. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da CGTase.

As temperaturas ótimas foram altas para as linhagens estudadas, sendo maior para linnagem *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* H27, as quais foram semelhantes à obtida pelo *Bacillus circulans* n°76 (SALVA *et al.*, 1997) que foi de 60°C-70°C. As linhagens *Bacillus lentus* (SABIONI, PARK, 1992), *Bacillus* sp alcalofílico (NAKAMURA, HORIKOSHI, 1976a) e linhagem n°37 (MATIOLI *et al.*, 1998) apresentaram picos de temperatura ótima menores de 45°C-50°C, 45°C e 50°C, respectivamente. A estabilidade térmica foi relativamente boa, uma vez que a apresentada pelos *Bacillus lentus* (SABIONI, PARK, 1992), *Bacillus* sp alcalofilico (NAKAMURA, HORIKOSHI, 1976a) foi de 55°C e 65°C em presença de cálcio. As temperaturas ótimas das enzimas foram altas, indicando possibilidades de aplicação industrial, principalmente quando associadas a uma maior termoestabilidade, viabilizando a produção das ciclodextrinas com custos menores.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, mais uma vez foi possível mostrar quão rica é a biodiversidade ecológica do Brasil, a qual resulta numa interminável possibilidade de obtenção de novas linhagens microbianas produtoras de enzimas de interesse industrial. Os processos utilizados, fermentação sólida ou submersa, assim como o tipo de substrato empregado como fonte de amido, influenciam significativamente a produção da enzima CGTase. Nas condições utilizadas, a fermentação submersa foi melhor para a produção da CGTase em todas as linhagens estudadas. As linhagens responderam de formas diferentes em relação à composição dos meios de produção, aquele composto por farelo de trigo mais farinha de soja foi o melhor para *Bacillus* sp H25 e *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 e o meio composto de farelo de trigo mais mandioca foi o melhor para os *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* H27 e H54. Outra constatação interessante foi a observação de que todas as cepas mostraram alta atividade enzimática no meio formulado com trigo e soja. Entre todos os meios sólidos testados esta foi a associação com o melhor balanço de aminoácidos, mostrando a importância destes na produção de CGTase pelas linhagens de *Bacillus* sp. Dada a escassez deste assunto na literatura, é razoável sugeri-lo como um bom tema para futuras investigações.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELYAN, V. A., AFYAN, K. B., AVAKYAN, Z. G., MELKUMYAN, A. G., AFRIKYAN, E. G. Cyclomaltodextrin glucotransferases from thermophilic actinomycetes. **Biochemistry (Moscow), 60**(10):1223-1229, 1995.

ALLEGRE, M., DERATANI, A. Cyclodextrin uses: from concept to industrial reality. **Agroo Food Industry Hi Tech.,** January/ February 9-17, 1994.

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2nd Ed. New York: McGraw-Hill International Editions, 1986. P.

BENDER, H. Production, Characterization, and application of cyclodextrins. **Advances in Biotechnological Processes, 6**:31-71, 1986.

BENDER, H. Cyclodextrin glucanotransferase von *Klebsiella pneumoniae* I. Synthese, Reinigung und eigenscha-ften des enzyms von *K. pneumoniae* M5al. **Arch. Microbiol., 111**:271-281, 1977.

DAMASO, M. C. T., ANDRADE, C. M. M. C., PEREIRA JR, N. Use of corncob for endoxyanase production by thermophilic fungus thermomyces lanuginosus IOOC-4145. **Applied Biochemistry and Biotechnology, 84**:821-834, 2000.

DIAS, A. A. M., ANDRADE, C. M. M. C., LINARDI, V. R. Production of amylases by candida in liquid and semisolid fermentation. **Revista de Microbiologia, 23**:189-193, 1992.

JAMUNA, R., SASWATHI, N., SHEELA, R., RAMAKRISHNA, S. V. Synthesis of Cyclodextrin glucosyltransferase by *Bacillus cereus* for the production of cyclodextrins. **Applied Biochemistry and Biotechnology, 43**:163-176, 1993.

LARSEN, K. L., ENDO, T., UEDA, H., ZIMMERMANN, W. Inclusion complex formation constants of α-, β-, γ-, δ-, ε-, ζ-, η- and θ-cyclodextrins determined with capillary zone electrophoresis. **Carbohydrate Research, 309**:153-159, 1998.

LEE, J. H., CHOI, K. H., LEE, Y. S., KWON, I.B., YU, J. H. Enzymatic production of α-cyclodextrin with the cyclomalto-dextrin glucanotransferase of *Klebsiella axytoca* 19-1. **Enzyme and Microbial Technology, 14**(12):1017-1020, 1992.

MÄKELA, M. J., KORPELA, T. K., PUISTO, J., LAAKSO, S. V. Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, and conversion mixture applications. **Journal Agric. Food Chemistry, 36**:83-88, 1988.

MATIOLI, G., ZANIN, G. M., GUIMARÃES, M. F., MORAES, F. F. Production and purification of CGTase of alkalophilic *Bacillus* isolated from Brazilian soil. **Applied Biochemistry and Biotechnology, 70-72**:267-275, 1998.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem., 31**:426-428,1959.

MORI, S., GOTO, M., MASE, T., MATSUURA, A., OYA, T., KITAHATA, S. Reaction conditions for the production of -cyclodextrin by cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp n° 9605. **Bioscience Biotechnology Biochemistry, 59**(6):1012-1015, 1995.

MORI, S., HIROSE, S., OYA, T., KITAHATA, S. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp n° 9605. **Biocience Biotechnology Biochemistry, 58**(11):1968-1972, 1994.

NAKAMURA, N., HORIKOSHI, K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. **Agric. Biol. Chem., 40**(4):753-757, 1976a.

NAKAMURA, N., HORIKOSHI, K. Purification and properties of neutral-cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. **Agric. Biol. Chem., 40**(9):1785-1791, 1976b.

PARK, C. S., PARK, K. H., KIM, S. H. A rapid screening method for alkaline β-cyclodextrin glucanotransferase using phenolftalein-methyl orange-containing-solid medium. **Agric. Biol. Chem., 53**(4):1167-1169, 1989.

PONGSAWASDI, P., YAGISAWA, M. Screening and indentification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal Fermentation Technology, 65**(4):463-467, 1987.

PSZCZOLA, D. E. Prodution and potencial food applications of cyclodextrins. **Food Technology,** January 96-100, 1988.

RAMAKRISHNA, S. V., SASWATHI, N., SHEELA, R., JAMUNA, R. Evaluation of solid, slurry, and submerged fermen-tations for the production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Bacillus cereus*. **Enzyme and Microbial Technology, 16**(5):441-444, 1991.

SABIONI, J. G., PARK, Y. K. Production and characterzation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus lentus*. **Starch/ Stärke, 44**(6):225-229, 1992.

SALVA, T. J. G.; LIMA, V. B.; PAGAN, A. P. Screening of alkalophilic bacteria for cyclodextrin glycosyltransferase production. **Revista de Microbiologia, 28:**157-164, 1997.

SHUKLA, T. P. Industrial Research on Cyclodextrins. **Cereal Foods World, 36**(4) 387, 1991.

STARNES, R. L. Industrial potencial of cyclodextrin glycosyltransferases. **Cereal Foods World, 35**(11): 1094-1099, 1990.

SZEJTLI, J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. **Journal Mater. Chemistry, 7**(4) 575-587, 1997.

SZEJTLI, J. Cyclodextrins in Pesticides. **Starch/Stärke, 37**(11) 382-386, 1985.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin in food, cosmetic and toiletries. **Starch/Stärke, 34**(11) 379-385, 1982.

TONKOVA, A. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. **Enzyme and Microbial Technology, 22** (june) 678-686, 1998.

VIHINEN, M.; MANTSALA, P. Microbial amylolytic enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and molecular Biology, 24**(4) 329-418, 1989.

WIND, R. D.; LIEBL, W.; BUITELAAR, R. M.; PENNINGA, D.; SPREINAT, A.; DIJKHUIZEN, L.; BAHL, H. Cyclodextrin formation by the thermostable α-amylase of *Termanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. **Applied and Environmental Microbiology, 61**(4) 1257-1265, 1995.

ZAMOST, B. L.; NIELSEN, H. K.; STARNES, R. L. Thermostable enzymes for industrial applications. **Journal of Industrial Microbiology, 8**:71-82, 1991.

Produção e aplicação de CGTase em produtos de panificação

Roberto da Silva[1]*; Heloiza Ferreira Alves-Prado[1]; Gisele Rodrigues Cucolo[1]; Eleni Gomes[1]; Célia Maria Landi Franco[1]

RESUMO

As ciclodextrinas (CDs) são formadas a partir do amido por ação da enzima ciclodextrina glicosiltransferse (CGTase). Elas se complexam com uma grande variedade de substâncias alterando as características da molécula complexada. Estudos que viabilizem a produção e aplicação das ciclodextrinas a um menor custo é de interesse industrial. O emprego da CGTase diretamente no processo onde a presença da CD é desejável, pode resultar em redução de custos. Assim, foi estudada a produção de CD em massa de pão, aplicando-se a CGTase durante a preparação da mesma. Após o forneamento, observou-se que a coloração do pão foi menos intensa nos pães com enzima que nos pães sem a enzima. A presença de CDs no miolo do pão foi confirmada por teste de coloracão com fenolftaleína. A quantificação da CD foi realizada no extrato do pão após forneamento e foi baseada no método CD-fenolftaleína o qual indicou a produção de 16 mg de CD para cada 100g de pão (bs).

SUMMARY

PRODUCTION AND APPLICATION OF CGTASE ON BAKED PRODUCTS: Cyclodextrins (CDs) are formed from starch by action of cyclodextrin glycosyltransferase enzyme (CGTase). They form complex with a large variety of substances and modifying the characteristics of the complexed molecule. Studies that make feasible the production and application of cyclodextrins at lower price are of industrial interest. The use of CGTase directly in process where the CD presence is desirable, may results in cost reduction. CD production was studied in bread by using the CGTase during preparation of the dough. After baking, it was observed that the coloration of bread with the enzyme was lower than those prepared without the enzyme. The presence of CD in the crumb of the bread was confirmed by coloration with phenolphthalein assays. The quantification of CD was determined from an extract of the bread after baking by using the CD-Phenolphthalein assay, which indicated the production of 16 mg of CD/100g of bread (db).

Palavras-chave: ciclodextrina glicosiltransferase, ciclodextrina, pão

1 - INTRODUÇÃO

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase; EC 2.4.1.19) é uma enzima, capaz de converter amido em ciclodextrina (CD). As ciclodextrinas são oligossacarídios cíclicos formados por monômeros de glicose, unidos por ligações glicosídicas α-1,4, sendo os tipos α-, β- e γ-CD os mais conhecidos [1; 3; 4; 8; 9; 10; 11; 12].

A capacidade das CDs em formar complexos de inclusão com uma grande variedade de substâncias orgânicas ou inorgânicas, pela incorporação destes no interior da sua cavidade hidrofóbica, foi denominado de "encapsulação molecular" e recebeu grande atenção porque

1* IBILCE- UNESP, R. Cristóvão Colombo, 2265, dasilva@qeg.ibilce.unesp.br

esta propriedade melhorava certas características físico-químicas da molécula encapsulada. Dentre estas melhorias, as especialmente importantes para a indústria de alimentos são a estabilização da cor e a redução da volatilidade. Da produção mundial de CDs, em 1999, 84% foi destinada a indústria de alimentos e cosméticos, sendo necessárias cerca de 20 a 40 toneladas de CDs por ano [1; 3; 4; 10; 11; 12].

Devido ao crescimento da demanda por este insumo, para evitar a elevação do preço, fontes alternativas, bem como técnicas eficientes de produção e aplicação das CDs, têm sido objeto de intensos estudos por pesquisadores em todo o mundo.

O emprego da CGTase diretamente no processo onde a presença da CD é desejável, pode ser uma estratégia que resulte em redução de custos. Produtos de panificação se enquadram nesta proposta de estudo. Entretanto, para levar adiante tal proposta é preciso verificar se ocorre a produção de CDs nas condições e ambiente no qual alguns produtos de panificações são fabricados. Assim, no presente trabalho foi estudada a produção de CD em massa de pão, aplicando-se a CGTase durante a preparação da mesma.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Enzima: CGTase do *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 [2].

2.2 - Produção da enzima por fermentação submersa: foi utilizado o meio nutriente alcalino otimizado [2]: 1,35% de amido solúvel; 0,49% de peptona; 0,59% de extrato de levedura; 0,1% de K_2HPO_4; 1,25% de Na_2CO_3 (adicionado após resfriamento); pH 10,10. Para produção da enzima, a bactéria foi cultivada em 200mL do meio em Erlenmeyers de 1000mL a 35°C sob agitação de 200 rpm, por 48 horas. O material fermentado foi centrifugado a 10000xg, por 15 minutos, sob refrigeração. O sobrenadante, livre das células, foi usado como solução enzimática.

2.3 - Cromatografia de troca iônica: a solução enzimática concentrada (sulfato de amônio a 80% de saturação) e dialisada (tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5) foi submetida a cromatografia de troca iônica em equipamento "AKTÄ purifier" contendo resina aniônica Q Sepharose® (Pharmacia). A resina foi equilibrada com tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,5. A amostra foi eluída com o mesmo tampão e fluxo de 1 mL/min. Para a eluição da enzima ligada à resina foi usado um gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl em 8 volumes de coluna (VC).

2.4 - Preparo dos pães: foram preparadas massas de pães contendo 1 colher rasa (café) de margarina; 1 colher rasa (chá) de açúcar; 1,7 g de fermento biológico; 40 g de farinha de trigo, 15 mL de água e 1 mL de CGTase (1300 U). Obteve-se, assim, pães de 60g antes do fomeamento. Foram preparados pães em duplicata com e sem a enzima (controle).

2.5 - Determinação de CD no pão: foram realizados dois testes quantitativos e um teste qualitativo para determinar a presença de CD nos pães. No teste qualitativo, amostras dos pães sem enzima e com enzima foram embebidos uma solução contendo 8 mL Na_2CO_3

[1*] IBILCE- UNESP, R. Cristóvão Colombo, 2265, dasilva@qeg.ibilce.unesp.br

0,25M e 0,2 mL fenolftaleína 2 mM (50% etanol) e observada a coloração da massa. Quando a CD está presente, ela se complexa com a fenolftaleína, proporcionando uma coloração clara ou incolor, quando a CD não está presente têm-se uma coloração rosa intenso. Para os métodos quantitativos, amostras dos pães foram maceradas em cadinho, em presença de água. Em seguida, foram centrifugadas a 10000xg /15 min. e o sobrenadante foi reservado para as análises, através dos métodos CD-fenolftaleína [2] e CD-TCE [6].

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verifica-se na *Figura 1*, que a enzima em questão foi eluída da coluna numa concentração salina de 0,18M de NaCl. Há relatos de purificação da CGTase em apenas uma etapa de purificação [5]. Observando o perfil de eluição, é possível supor que esta etapa de purificação foi eficiente no isolamento da CGTase de outras proteínas da solução enzimática.

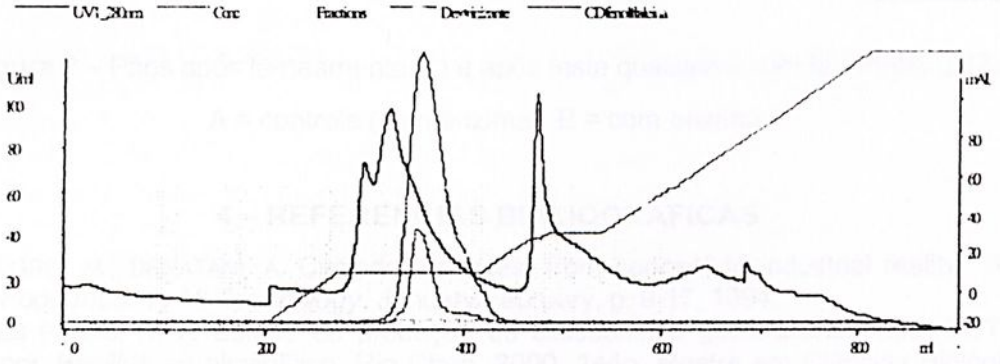


Figura 1 - Perfil de eluição da CGTase em cromatografia de troca iônica Q Sepharose.

As análises dos pães demostraram que houve a atuação da CGTase. Os pães controle (sem enzima) apresentaram uma coloração mais escura, quando comparados aos pães com enzima. De alguma forma a CD produzida reduziu a intensidade da reação de Maillard durante o forneamento. É possível que através da atividade de desproporcionação a CGTase tenha reduzido o número de redutores presentes na massa reduzindo a reação de Maillard que proporciona a cor típicas em produtos forneados. Através do teste qualitativo comprovou-se a ação da CGTase com formação de CDs. A coloração dada pela solução de fenolftaleína + Na_2CO_3 foi mais clara no pão com enzima, que quando comparada a coloração apresentada pelo pão controle (*Figura 2*). O método CD-TCE também detectou a presença de CD, através da análise dos extratos obtido dos pães com enzima e sem enzima. Foram realizadas várias diluições desses extratos, havendo a precipitação de CD até o fator de diluição de 2, no extrato dos pães com enzima. Com o teste quantitativo, baseado no método CD-fenolftaleína, analisou-se os extratos das massas de pães com enzima e sem enzima e foi possível identificar a presença da CD. Sendo que em média, para cada 100g de pão (bs) houve uma produção de 16 mg de CD. Esta concentração, corresponde a aproximadamente 0,02% de CD

[1] IBILCE - UNESP, R. Cristóvão Colombo, 2265, dasilva@qeg.ibilce.unesp.br

no pão. Tal concentração é bem menor que a de 2% [4] para produtos forneados, sugerida pelos fabricantes ao FDA para liberação deste insumo. Assim, tal concentração de CD não traria problemas para o consumo destes pães. Em conclusão, neste trabalho foi constatado que o emprego da enzima CGTase diretamente no processo de fabricação de pão resulta em produção de ciclodextrinas na massa deste produto. Nossa próxima etapa será a investigação da eficiência desta CD quanto aos atributos esperados, nas condições em que são feitos alguns produtos de panificação.

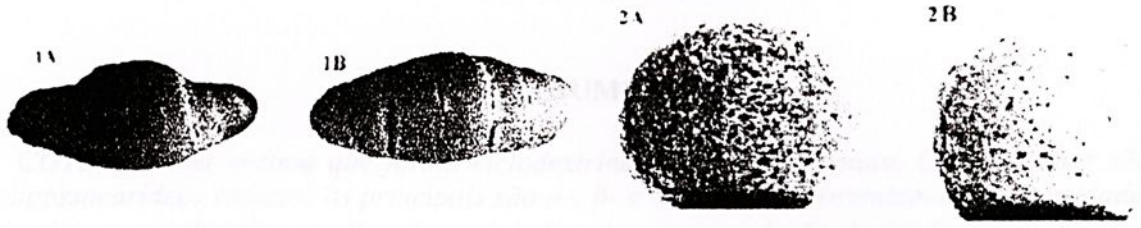


Figura 2 – Pães após forneamento (1) e após teste qualitativo com fenolftaleína (2).
A = controle (sem enzima), B = com enzima.

4 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 ALLEGRE, M.; DERATANI, A. Cyclodextrin uses: from concept to industrial reality. *Agroo Food Industry Hi Technology*. January/February, p. 9-17, 1994.

2 ALVES PRADO, H. F. Estudo da produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus* sp alcalofílico. Rio Claro, 2000. 144p. Mestre em Ciências Biológicas, Área de microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

3 BENDER, H. Production, Characterization, and application of cyclodextrins. *Advances in Biotechnological Processes*. v.6, p. 31-71, 1986

4 HEDGES, A.; McBRIDE, C. Utilization of β-cyclodextrin in food. *Cereal Foods World*, v.44, n. 10, p. 700-704, 1999.

5 MARTINS, R.F.; HATTI-KAUL, R. A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterization. *Enzyme and Microbiol Technology*. v. 30, n. 1, p. 116-124, 2002.

6 NOMOTO, M.; SHEW, D.C; CHEN, S.J.; YEN, T.M.; LIAO, C.W.; YANG, C.P. Cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic bacteria of taiwan. v. 48, n. 5; p. 1337-1338, 1984.

7 PSZCZOLA, D.E. Production and potencial food applications of cyclodextrins. *Food Technology*. January, p.96-100, 1988.

8 ROBYT, J.F. Cyclodextrins. In: Essentials of carbohydrate chemistry. New York, Springer, 1998. Cap. 8, p. 245-250.

9 SMITH, D.M.; AWAD, A.C.; BENNINK, M.R. e GILL, J.L. Cholesterol reduction in liquid egg yolk using β-cyclodextrin. *Journal of Food Science*. v.60, n.4, p. 691-694, 1995.

10 STARNES, R.L. Industrial potencial of cyclodextrin glycosyltransferases. *Cereal Foods World*. v.35, n.11, p. 1094-1099, 1990.

11 SZEJTLI, J. Cyclodextrin in food, cosmetic and toiletries. *Starch/Stärke*. v.34, n.11, p.379-385, 1982.

12 SZEJTLI, J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *Journal Mater. Chem.* v.7, n.4, p.575-587, 1997.

Os autores agradecem à FAPESP pelos auxílios concedidos.

[1*] IBILCE- UNESP, R. Cristóvão Colombo, 2265, dasilva@qeg.ibilce.unesp.br

Seleção de Substratos para Produção de CGTase pelo *Bacillus* sp Subgrupo *alcalophilus* E16.

Gisele Rodrigues Cucolo[1], Heloiza F. Alves-Prado[1], Eleni Gomes[1] e Roberto da Silva[1].

[1]Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada - IBILCE/UNESP
Caixa Postal 136- CEP 15054-000 -- São José do Rio Preto - SP
E-mail: giselecucolo@hotmail.com

RESUMO

CGTase é uma enzima que forma ciclodextrinas a partir do amido. Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, as principais são a-, ß- e ?-CD, que apresentam 6, 7 e 8 unidades de glicose interligadas por ligações a-1,4. Estudou-se a produção de CGTase pelo Bacillus sp alcalofílico em fermentação submersa (FS) e fermentação em substrato sólido (FSS). As FS foram realizadas com peptona e extrato de levedura (meio A) e sem estes nutrientes (meio B), tendo como substrato diferentes fontes de amido. A FSS foi realizada com farelo de trigo misturado a de diferentes fontes de amido. A analise da produção de CGTase para FS foi significativa para o meio A contendo maisena, polvilho e amido solúvel e no meio B para o contendo fubá. Na FSS a maior produção enzimática ocorreu nos meios contendo farelo de trigo (ft), ft + farelo mandioca, ft + farelo de soja e ft+ fubá.

INTRODUÇÃO

A ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) é uma enzima de cadeia única, com peso molecular de 74,5 e apresenta uma seqüência de aminoácidos que revela uma similaridade estrutural com a enzima a-amilase. Essa enzima é capaz de formar ciclodextrinas (CDs) a partir do amido. A CGTase é composta de uma cadeia única de polipeptídios com aproximadamente 650 aminoácidos. Essa enzima não possui ligações intramoleculares por pontes de dissulfeto, mas necessita de cálcio para manter sua atividade catalítica (MATIOLI, 2000). Esta enzima vem ganhando grande interesse industrial, devido ao aumento do uso das CDs nas indústrias alimentícias e farmacêuticas.

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por monômeros de glicoses, unidos por ligações glicosídicas a-1,4. As CDs mais conhecidas são do tipo a-, ß- e ?- CD, consistindo de seis, sete e oito monômeros de glicose, respectivamente. Estes monômeros estabelecem interações intermoleculares, formando um anel, conferindo rigidez à molécula de ciclodextrina (PSZCZOLA, 1988).

A característica mais marcante das ciclodextrinas é a capacidade que possui de formar complexos de inclusão com uma grande variedade de substâncias em virtude da sua estrutura geométrica, com a cavidade interna hidrofóbica e a região externa hidrofílica. Esse fenômeno, denominado como "encapsulação molecular" pode melhorar as propriedades químicas e físicas da molécula encapsulada. Essa capacidade das CDs de formar complexos de inclusão, favorece um grande número de aplicações em indústrias de alimentos, de cosméticos, farmacêuticas, agroquímicas, químicas e outras. A substância encapsulada tem suas propriedades físico-químicas alteradas que resultam em melhor estabilidade, , solubilidade, biodisponibilidade e menor volatilidade e, os efeitos benéficos proporcionados pelo uso de CDs incluem: proteger princípios ativos contra a oxidação pela luz, calor e volatilidade; mascarar, reduzir ou eliminar odores e sabores indesejáveis; estabilizar cores, tintas,

"flavours", vitaminas, temperos ou emulsões; aumentar a solubilidade de drogas e substâncias químicas (YU *et al.*, 1988).

NAKAMURA & HORIKOSHI (1976) propuseram dois tipos de meio de produção de CGTase, um com amido solúvel e caldo de maceração de milho e outro denominado de meio II, composto de amido solúvel, extrato de levedura, peptona, K_2HPO_4, $MgSO_4.H_2O$ e Na_2CO_3. Esse último meio foi o mais difundido entre os pesquisadores para a produção de CGTase, principalmente empregando microrganismos do gênero *Bacillus*.

Techaiyakul e colaboradores (1990) verificaram a influência de diferentes tipos de amidos na produção da CGTase pelo *Bacillus* A11. A produção de CGTase foi maior quando da utilização dos amidos de arroz, de milho e de batata. Os amidos de mandioca e de trigo apresentaram rendimento menor. Também foi verificado que a concentração de amido influenciava a produção da CGTase (MATIOLI, 2000).

Os meios de culturas tradicionais são formulados com fontes de carbono, de nitrogênio e, principalmente de vitaminas e aminoácidos que acarretam consideráveis custos na produção industrial de enzimas. Pesquisas dirigidas à produção de enzimas, utilizando resíduos agroindustriais de baixo custo, visando à substituição das fontes convencionais de C e N, são importantes para avaliar economicamente o uso das enzimas em escala comercial (DAMASO *et al.*, 2000). Assim, pesquisas dirigidas à produção das CGTases de menor custo terão importantes reflexos nos custos das CDs contribuindo para a viabilizar economicamente o uso das CDs em escala comercial Neste sentido, no presente trabalho foi estudada a produção de CGTase em substratos de baixo custo pelo *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 em fermentação submersa (FS), meio A e B, e fermentação em substrato sólido (FSS).

MATERIAL E MÉTODOS

-Microrganismo: O microrganismo utilizado foi isolado por ALVES-PRADO (2000) no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (IBILCE / UNESP) e identificado como *Bacillus* sp subgrupo *alcalophilus* E16 pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" – Campinas – SP.

- Determinação da Atividade da CGTase: A atividade da CGTase foi analisada pelo método CD- fenolftaleína baseado no proposto por MÄKELÄ *et al* (1988). Para o método CD-fenolftaleína foi usado 0,1mL de solução enzimática adicionada a 0,8mL de solução de amido solúvel a 1,0%, em tampão acetato 0,1M, pH 5,5. Após incubação a 55°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada com a adição de 4,0mL de solução de Na_2CO_3, 0,25M. Em seguida, foi acrescentado 0,1mL de solução de fenolftaleína (50% etanol) a 1mM. O controle recebeu a solução enzimática apenas no momento da leitura. A absorbância foi determinada em 550nm. Uma unidade de atividade enzimática fenolftaleína é definida como a quantidade de enzima, necessária para produzir 1μmol de β-ciclodextrina, por minuto e por mL de solução enzimática.

–Estudo da Produção de CGTase em Diferentes Fontes de Carbono :

Fermentação Submersa: A fermentação submersa foi realizada em erlenmeyers de 125mL contendo 20mL de meio. Cada erlenmeyer foi inoculado com 0,5mL de um pré- inóculo de 24h, incubado a 35°C sob agitação de 150rpm. O meio utilizado como pré-inoculo teve como composição: 0,5% de extrato de levedura; 0,5% de peptona; 0,1 % de K_2HPO_4; 0.02% de $MgSO_4$; 1% de amido solúvel; 1.3% de Na_2CO_3 (autoclavado separado). Foram testados dois meios (A e B) para fermentação submersa. O meio A teve a mesma composição do pré-

inóculo, mas o substrato foi variado e foram utilizados como substrato farelo de mandioca; amido de batata-doce; polvilho doce; maisena; fubá e amido solúvel. Para o meio B utilizou-se também a mesma composição do meio do pré- inoculo, mas sem peptona e extrato de levedura, e os substratos usados foram farelo de mandioca; amido de batata-doce; polvilho doce; maisena; fubá; extrato de soja; farinha de soja; farelo de soja; soja; farelo de trigo e amido solúvel O material fermentado foi centrifugado a 10.000xg, por 15 minutos, sob refrigeração a 5^0C. O sobrenadante foi utilizado para as análises enzimáticas pelo método pelo CD-fenolftaleína como descrito anteriormente.

Fermentação em Substrato Sólido (FSS): As fermentações em substrato sólido foram realizadas em erlenmeyers de 250mL a 35^0C, contendo 5g de substrato cada. Os substratos utilizados foram: farelo de trigo, farelo de soja e diferentes misturas de farelo de trigo com outras fontes de carbono, ricas em amido (amido solúvel, farinha de trigo, maisena, polvilho, farelo de soja, fubá, farelo de mandioca e farinha de soja). Para as misturas foi mantida uma proporção de 1:1. Cada erlenmeyer foi inoculado com 2.5mL de pré inoculo de 24h, composição deste descrita acima. O material fermentado foi filtrado e centrifugado a 10.000xg, por 15 minutos, sob refrigeração de 5^0C. O sobrenadante foi utilizado para as análises enzimáticas o método CD-fenolftaleína como descrito anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fermentação Submersa:

Entre os substratos analisados para a formulação do meio A, as melhores atividades enzimáticas foram encontrados nos meios contendo os substratos maisena, amido solúvel e polvilho (figura 1).

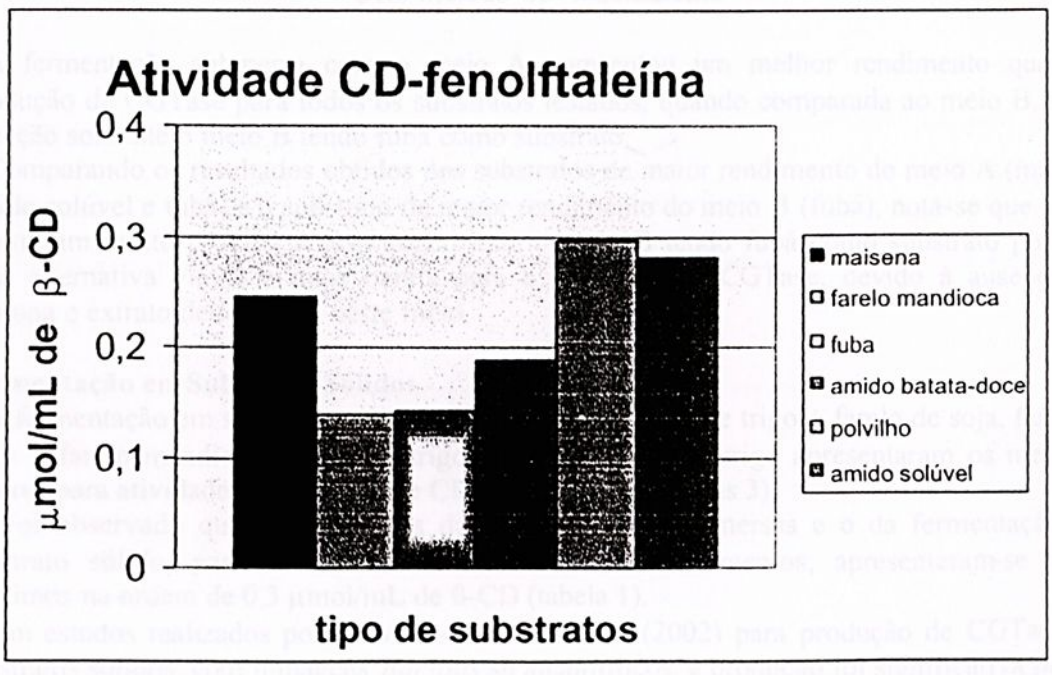


Figura 1: Produção da CGTase no meio A com diferentes substratos. Atividade determinada pelo método CD-fenolftaleina.

Utilizando o meio B, a melhor produção de CGTase ocorreu na fermentação contendo fubá (figura 2).

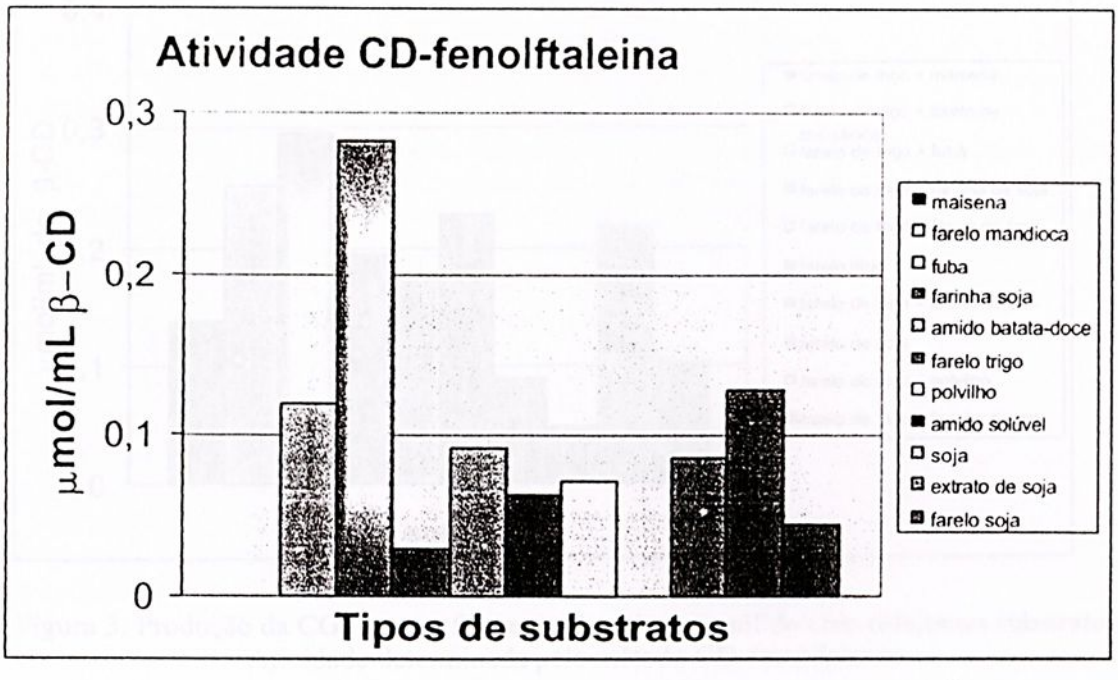


Figura 2: Produção da CGTase no meio B com diferentes substratos. Atividade determinada pelo método CD-fenolftaleina.

A fermentação submersa com o meio A apresentou um melhor rendimento quanto à produção de CGTase para todos os substratos testados, quando comparada ao meio B, sendo exceção somente o meio B tendo fubá como substrato.

Comparando os resultados obtidos dos substratos de maior rendimento do meio A (maisena, amido solúvel e fubá) e o substrato de maior rendimento do meio B (fubá), nota-se que eles se mostraram muito próximos. Isso sugere que o meio B tendo fubá como substrato pode ser uma alternativa viável e mais barata para a produção de CGTase, devido à ausência de peptona e extrato de levedura neste meio.

Fermentação em Substrato Sólido:

A fermentação em substrato sólido (FSS) contendo farelo de trigo + farelo de soja, farelo de trigo + farelo mandioca, farelo de trigo + fubá e farelo de trigo apresentaram os melhores valores para atividade dextrinizante e CD- fenolftaleina (figuras 3).

Foi observado que os resultados das fermentações submersas e o da fermentação em substrato sólido, para os substratos com melhores rendimentos, apresentaram-se muito próximos na ordem de 0,3 µmol/mL de ß-CD (tabela 1).

Em estudos realizados por ALVES-PRADO *et al.* (2002) para produção de CGTase em substratos sólidos, com linhagens *Bacillus* sp alcalofílicos, a produção foi significativa para os meios compostos por farelo de trigo + farinha de soja, seguido pelos meios de farelo de trigo + mandioca e o de farelo de trigo sem misturas.

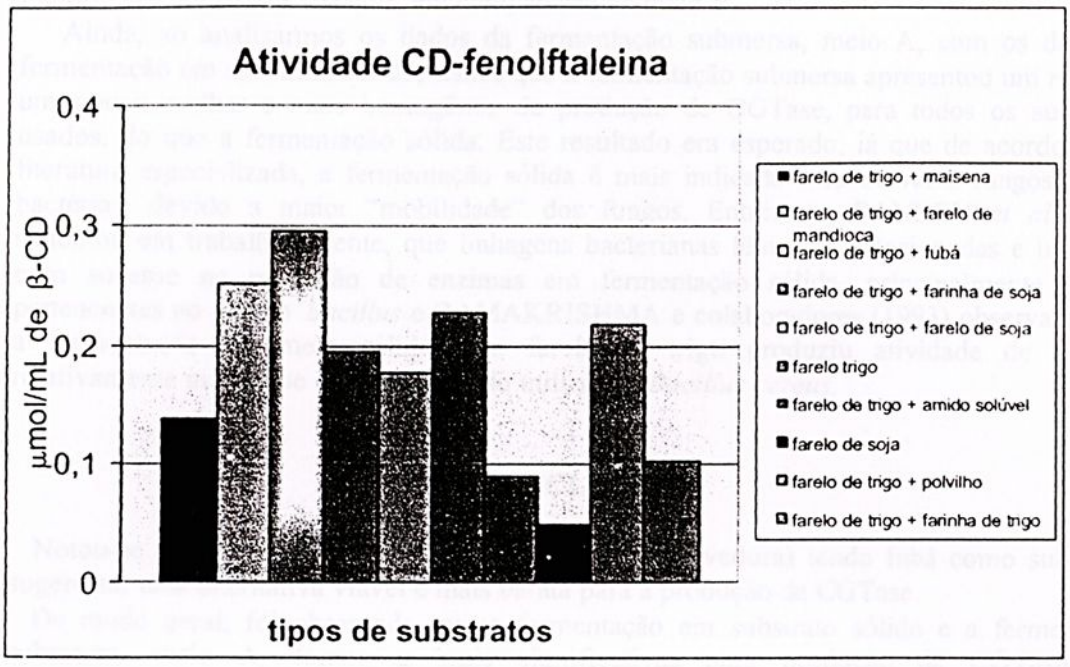


Figura 3: Produção da CGTase em fermentação substrato sólido com diferentes substratos. Atividade determinada pelo método CD- fenolftaleina

Conforme apresentado na tabela 1, houve detecção de atividade proteolítica na maioria dos meios indicados como melhores, sendo exceção o meio A com polvilho como substrato.

Tabela 1: Comparação dos melhores substratos em fermentação submersa e substrato sólido

	Composição do meio	Atividade CD-fenolftaleina µmol/mL	Presença de proteases
Meio A	maisena	0,24	Sim
	amido solúvel	0,28	Sim
	polvilho	0,30	Não
Meio B	fubá	0,28	Sim
Meio FSS	farelo de trigo + farelo de soja	0,18	Sim
	farelo de trigo	0,23	Sim
	farelo de trigo + farelo mandioca	0,25	Sim
	farelo de trigo + fubá	0,29	Sim

De modo geral, a fermentação submersa no meio A, com peptona e extrato de levedura, e a fermentação sólida, obtiveram um rendimento melhor quanto á produção de CGTase, para a maioria dos substratos testados, em comparação ao meio B.

Ainda, ao analisarmos os dados da fermentação submersa, meio A, com os dados da fermentação em substrato sólido, temos que a fermentação submersa apresentou um resultado um pouco melhor e mais homogêneo de produção de CGTase, para todos os substratos usados, do que a fermentação sólida. Este resultado era esperado, já que de acordo com a literatura especializada, a fermentação sólida é mais indicada e favorável a fungos do que bactérias, devido a maior "mobilidade" dos fungos. Entretanto, PANDEY *et al* (2000), salientou em trabalho recente, que linhagens bacterianas têm sido selecionadas e utilizadas com sucesso na produção de enzimas em fermentação sólida, principalmente aquelas pertencentes ao gênero *Bacillus* e RAMAKRISHMA e colaboradores (1993) observaram que a fermentação em meio sólido com farelo de trigo produziu atividade de CGTase relativamente maior que em meio líquido utilizando *Bacillus cereus*.

CONCLUSÕES

Notou-se que o meio B (sem peptona e extrato de levedura) tendo fubá como substrato, sugere ser uma alternativa viável e mais barata para a produção de CGTase.

De modo geral, foi observado que a fermentação em substrato sólido e a fermentação submersa, meio A, foram as mais significativas para produção de CGTase pelo microrganismo em estudo, na maioria dos substratos usados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e a PROAP ao suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES PRADO, H. F Estudo da produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus* sp alcalofílico. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 2000.

ALVES PRADO, H. F., HILÁRIO, E., GOMES, E., DA SIILVA, R. Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 5, p. 189-196, 2002.

DAMASO, M.C.T., ANDRADE, C.M.M.C., PEREIRA JR, N. Use of corncob for endoxyanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* IOOC-4145. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.84, p. 821-834, 2000.

MÄKELÄ, M. J., KORPELA, T. K., PUISTO, J. AND LAAKSO, S. V. Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, and conversion mixture applications. *Journal Agric. Food Chem.* v. 36, p. 83-88, 1988.

MATIOLI, G.; ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. *Ciclodextrinas: e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura, biotecnologia, química analitica e produtos gerais*. Maringá: Eduem, 2000.

NAKAMURA, N., HORIKOSHI, K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glucanotransferase- producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Agric. Food Chem.*, v. 40, n. 5, p. 753-757, 1976.

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.

PSZCZOLA, D. E. Production and potential food applications of cyclodextrins. *Food Technology*. January, p.96-100, 1988.

RAMAKRISHNAA, S.V., SASWATHI, N., SHEELA, R., JAMUNA, R. Evaluation of solid, slurry, and submerged fermentations for the production of cyclodextrin glycosultransferase by *Bacillus cereus. Enzyme and Microbial Technology*. v. 16 (5), p. 441-444, 1994.

YU, E. K. C.; AOKI, H. AND MISAWA, M. Specific alpha-cyclodextrin production by a novel thermostable cyclodextrin glycosyltransferase. *Applied Microbiol Biotechnol*. v.28, p. 377-379, 1988.

Produção de Ligninases por Fungos de Degradação Branca em Resíduos Agroindustriais

BONFÁ, M. R. L. [1], XAVIER-SANTOS, S. [1], CARVALHO, C. C. [1], DA SILVA, R. [1] & GOMES, E[1].

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP –
Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada –
R. Cristovão Colombo, 2265 – Jd. Nazareth – CEP 15054.000
São José do Rio Preto - SP – E-mail: maricybonfa@yahoo.com.br

RESUMO

Ensaios foram feitos para avaliar a viabilidade do uso de resíduos agrícolas como substrato para o crescimento de fungos decompositores de madeira e produção das ligninases (manganês peroxidase (Mn-P), lignina peroxidase (Li-P) e lacase). Foram utilizadas as espécies Gloephylum striatum, Phellinus rimosus e Coriolopsis byrsina, fungos pertencentes a subdivisão Basidiomycotina, para ensaios de produção das enzimas em três resíduos agrícolas (farelo de trigo, palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar). As atividades das três enzimas foram produzidas por todos os fungos, porém em diferentes substratos. As atividades enzimáticas obtidas mostraram o excelente potencial desses microrganismos para produção de ligninases.

INTRODUÇÃO

Juntamente com a celulose e a hemicelulose, a lignina é um dos principais constituintes da madeira, sendo responsável pela sua resistência. É um biopolímero aromático amorfo, tridimencional, formado via polimerização oxidativa. Este ocorre na parede celular de plantas superiores em diferentes composições: madeiras duras de 25 a 35%, madeiras macias de 18 a 25% e gramíneas de 10 a 30% (Goldstein, 1976; Bononi, 1999; Lars, 2000).

Além de fundamental para o equilíbrio das cadeias tróficas, a degradação da lignina apresenta grande importância econômica, tornando disponíveis substâncias de interesse na indústria, pecuária e na agricultura.

Durante o processo de degradação da madeira microrganismos transformam o material orgânico componente da madeira, em CO_2, termoenergia e humus como produtos finais. Além dos fungos, bactérias e actinomicetos também produzem enzimas que atuam sobre a lignina, porém em menores proporções. O fungo tem facilidade de acesso ao substrato, uma vez que as hifas do micélio penetram nos tecidos vegetais melhor do que bactérias e actinomicetos e dessa forma, têm acesso ao conteúdo celular indisponível para outros microrganismos do mesmo ambiente (Wubah *et al.*, 1993; Bononi, 1997).

Os principais agentes de degradação da lignina estão entre os fungos da decomposição branca que são dotados de um sistema ligninolítico constituído de peroxidades (Lignina e Manganês-Peroxidase) e da lacase, essas enzimas atribuem aos fungos a capacidade de desestabilizar a estrutura da da lignina (Périé, *et al.*, 1998; Bononi, 1997; Cloete & Celliers, 1999; Bononi, 1999; Chagas e Durrant, 2001).

A LiP é uma glicoproteína que contém ferroprotoporfirina IX (heme) como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio para sua ação catalítica. A LiP oxida a lignina e outros compostos derivados da mesma, além de compostos não fenólicos por retirada de elétron de um núcleo aromático, criando radical instável que passa por numerosas transformações levando à decomposição do substrato (Rodriguez, Durán, 1988). A ação dessa enzima resulta em: oxidação de álcoois benzílicos, quebra de cadeias aromáticas, desmetilação, rearranjos intramoleculares e quebra de anéis em compostos não fenólicos relacionados à lignina (Gold *et al.*, 1989). O álcool veratrílico é o redutor preferido pela LiP, sendo produzido pelo fungo de degradação branca após lignólise e, aparentemente, protege a enzima contra inativação pelo excesso de peróxido de hidrogênio. Na presença de peróxido de hidrogênio, a LiP oxida o álcool a veratraldeído, reação esta comum em ensaios de atividade da LiP (Durán, Espósito, 1997).

A Manganês Peroxidase (Mn-P) é muito semelhante à LiP, entretanto, além do peróxido de hidrogênio requer íons Mn^{+2} e oxida Mn(II) a Mn(III) (Crawford & Pometto, 1988). Lacases são fenoloxidases pertencentes ao grupo das oxidases, produzidas por fungos e plantas. Possuem um íon Cu^{+2} em seu sítio ativo, que por processo oxidativo remove fenil-propano mais externo à cadeia, gerando radicais fenoxila. Esses radicais atuam em reações não catalíticas, como acoplamento radical-radical, desprotonação a ataques nucleofílicos pela água, levando a reações de polimerização, quebras alquiarílicas e oxidações nos centros ativos e desmetilações. Alguns intermediários aromáticos de baixo peso molecular acabam também liberados resultando na despolimerização da lignina (Tien & Kirk, 1988).

Mais recentemente, as ligninases têm sido consideradas como uma promissora alternativa biotecnológica para a remoção de compostos tóxicos do ambiente. Um dos principais exemplos tem sido na indústria têxtil, onde existe um vasto consumo de água e componentes químicos durante o processo de tingimento, o que resulta em efluentes altamente complexos e recalcitrantes. Além disso, estudos têm mostrado que algumas classes de corantes, principalmente azocorantes, e seus subprodutos, podem ser carcinogênicos e ou mutagênicos (Kunz *et al.*, 2002). Enzimas como a Li-P, Mn-P e Lacase podem promover a degradação desses compostos.

t. 1315/04

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Microorganismos

Foram utilizados os fungos basidiomicetos: *Gloeophylum striatum* 40; *Phellinus rimosus* 47 e *Coriolopsis byrsina* 146. Esses fungos foram coletados sobre troncos e galhos de árvores em decomposição, em dois trechos de mata remanescente da Estação Ecológica do Noroeste Paulista, nos municípios de São José do Rio Preto e Mirassol/SP.

2. Fermentação Sólida

Os fungos foram cultivados em meio sólido constituído de farelo de trigo e outros dois resíduos agrícolas lignocelulósicos, bagaço de cana-de-açúcar e palha de arroz. Os materiais foram triturados até partículas de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, e 5 gramas de cada um foram transferidos para erlenmeyer de 250 mL, esterilizados em autoclave e hidratados até 70% de umidade com a adição de 10 mL de solução de sulfato de amônio à 1% e de sulfato de magnésio à 0,01%. A inoculação dos substratos foi feita por transferência de 2 blocos (2 cm^2 cada) de cultura previamente miceliada em meio sólido PDA, para cada 5g de substrato a ser fermentado. A incubação foi feita a 27 °C, durante 7 semanas.

A cada sete dias, o material fermentado de um frasco erlenmeyer, foi suspendido em água destilada (8mL/g de material fermentado no caso do farelo de trigo e palha de arroz, e 12 mL/g no bagaço de cana), agitado por uma hora a 100 rpm, filtrado a vácuo e centrifugado. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta para os testes de atividade enzimática.

Lab. de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP
BIBLIOTECA
S. J. Rio Preto

3. Determinação da atividade enzimática

A atividade de Mn-P na solução enzimática bruta foi determinada a 30°C numa mistura de reação composta de 0,8 mL de tampão lactato de sódio a 0,05M (pH 4,5), 0,1 mL de solução de $MnSO_4$ a 0,4M e 0,1 mL da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (40 µM) e a absorbância medida a 270nm. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de Mn^{+3} por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de 8,1 x 10^3/mol/cm (Glenn *et al.*,1986; Aitken & Irvine, 1990).

A atividade de Li-P na solução enzimática bruta foi determinada a 30°C numa mistura de reação composta de 0,8 mL de tampão tartarato dissódico a 0,05M (pH 3,0), 0,1 mL de solução de álcool veratrílico a 40 mM e 0,1 mL da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,2 mM) e o aumento da absorbância, devido à oxidação do álcool veratrílico, medido a 310nm. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de veratraldeído por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de 9,3 x 10^3/mol/cm (Tien & Kirk, 1988).

A atividade de lacase foi determinada a 30°C usando 2,2"-azino-bis-etilbenthiazolina (ABTS) como substrato, em mistura contendo 0,1 mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0), 0,8 mL de solução de ABTS a 0,03% (p/v) e 0,1 mL da solução enzimática bruta (Buswell *et al.* 1995). A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de ABTS por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de 3,6 x 10^4/mol/cm para o ABTS oxidado (Bourbonnais, Paice, 1988). As atividades enzimáticas foram expressas em unidade de enzima por grama de substrato lignocelulítico (U/g).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 01 ilustra a produção de ligninases em fermentação sólida, pela espécie *G striatum*, nos diferentes substratos. Analisando-se os dados da Figura 01-A, pode-se verificar que a atividade de manganês peroxidase (Mn-P) foi maior em bagaço de cana-de-açúcar, com pico de produção na terceira semana de fermentação (805,4 U/g).

A análise das atividades de lignina peroxidase (Li-P) (Fig. 01-B), produzidas nos três meios, revela valores bastante homogêneos entre a segunda e quinta semana em meio contendo farelo de trigo, sendo o pico de atividade de 10118,3 U/g.

Quanto à lacase, (Fig. 01-C) a maior produção foi detectada em bagaço de cana-de-açúcar em amostradas coletadas na terceira semana de fermentação (765,7 U/g). O perfil de produção dessa enzima foi semelhante ao observado para a Mn-P, com diferentes picos de atividade ao longo do período de fermentação, sendo os picos de produção das enzimas, coincidentes na terceira semana, quando os meios foram bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo.

A Figura 02 mostra a produção de ligninases pela espécie P. *rimosus*, em fermentação sólida, nos diferentes substratos lignocelulíticos. Analisando-se a produção de Mn-P (Fig. 02-A),verifica-se que esta foi maior em farelo de trigo, sendo obtido o maior pico na terceira semana (6738,3 U/g).

Na Figura 02-B, observa-se que a produção de Li-P foi maior em farelo de trigo, sendo o pico de produção obtida na sétima semana (498,1 U/g). A análise da atividade de lacase (Fig. 02-C), mostra maior produção em farelo de trigo, com pico de produção na terceira semana (5179,2 U/g).

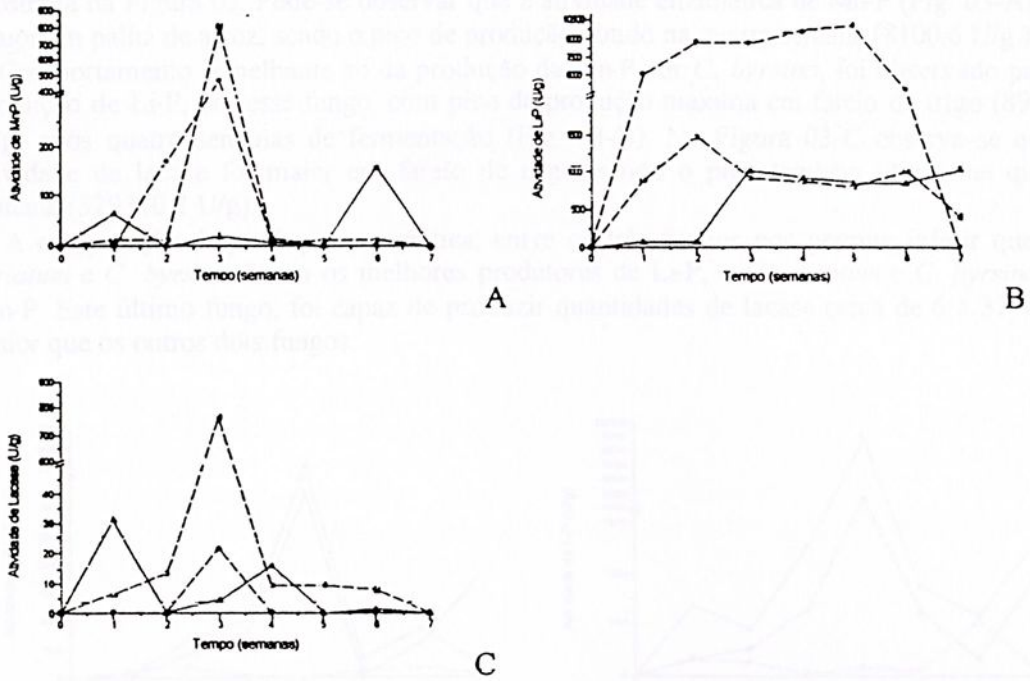


Figura 01 – Efeitos do tempo e do meio de cultivo sobre a produção de ligninases por *Gloeophylum striatum*. (A) atividade de MnP; (B) atividade de LiP e (C) atividade de lacase.
Legenda: —?— Farelo de trigo; ---- ? —— Cana-de-açúcar; -·-· ? -·-· Palha de Arroz.(verificar)

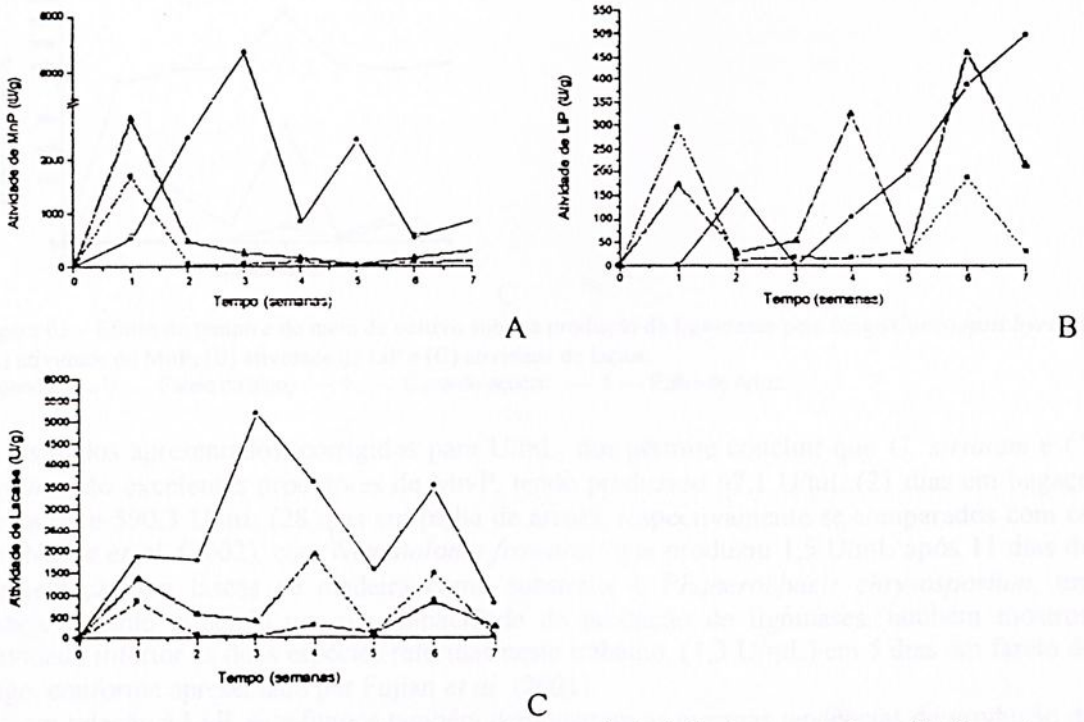


Figura 02 – Efeitos do tempo e do meio de cultivo sobre a produção de ligninases pelo fungo *Phellinus rimosus*. (A) atividade de MnP; (B) atividade de LiP e (C) atividade de lacase.
Legenda: ° ? — Farelo de trigo; —— ? ---- Cana-de-açúcar; -·-· ? -·-· Palha de Arroz.

A produção de ligninases em fermentação sólida pela espécie *Coriolopsis byrsina*, é mostrada na Figura 03. Pode-se observar que a atividade enzimática de Mn-P (Fig. 03-A), foi maior em palha de arroz, sendo o pico de produção obtido na quarta semana (8100,6 U/g).

Comportamento semelhante ao da produção da Mn-P por *C. byrsina*, foi observado para a produção de Li-P, por esse fungo, com pico de produção máxima em farelo de trigo (8968,0 U/g) após quatro semanas de fermentação (Fig. 03-B). Na Figura 03-C observa-se que a atividade de lacase foi maior em farelo de trigo, sendo o pico também obtido na quarta semana (329310,2 U/g).

A comparação da produção enzimática, entre os três fungos nos permite inferir que *G. striatum* e *C. byrsina* foram os melhores produtores de Li-P, e *G. striatum* e *C. byrsina*, de Mn-P. Este último fungo, foi capaz de produzir quantidades de lacase cerca de 6 a 37 vezes maior que os outros dois fungos.

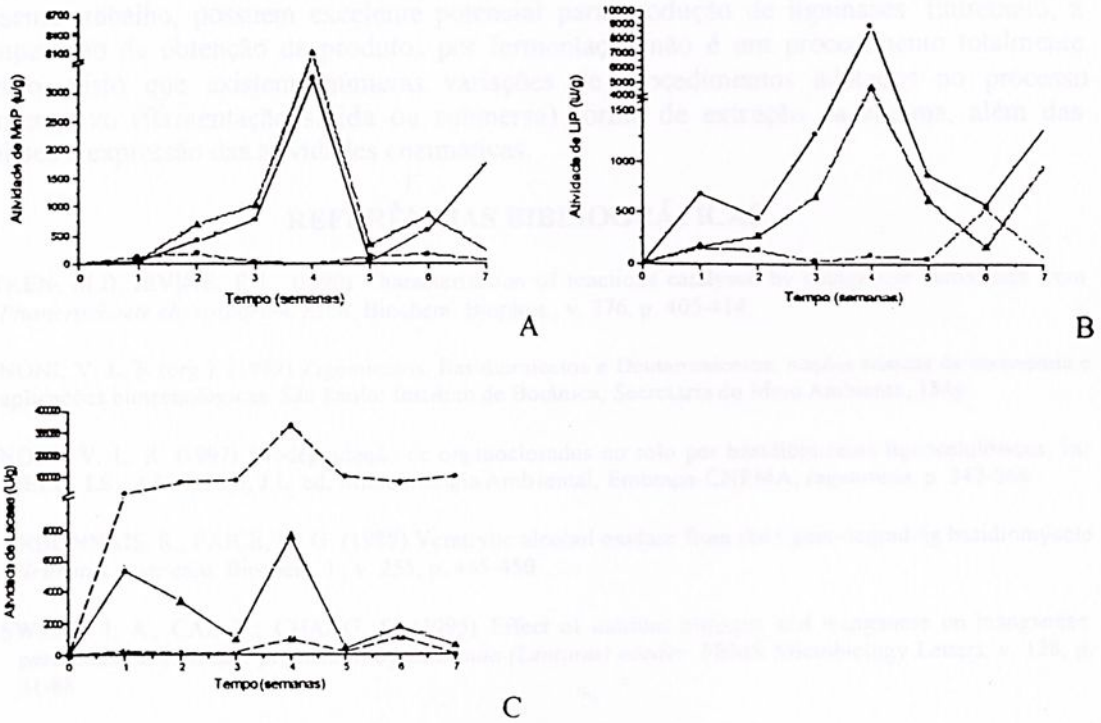


Figura 03 – Efeito do tempo e do meio de cultivo sobre a produção de ligninases pelo fungo *Coriolopsis byrsina*. (A) atividade de MnP; (B) atividade de LiP e (C) atividade de lacase.
Legenda: — ? — Farelo de trigo; ---- ? ---- Cana-de-açúcar; --- ? --- Palha de Arroz.

Os dados apresentados, corrigidos para U/mL, nos permite concluir que *G. striatum* e *C. byrsina* são excelentes produtores de Mn-P, tendo produzido 67,1 U/mL (21 dias em bagaço de cana) e 590,3 U/mL (28 dias em palha de arroz), respectivamente se comparados com os de Nüske *et al.* (2002), com *Nematoloma frowardii* que produziu 1,5 U/mL após 11 dias de fermentação em lascas de madeira como substrato, e *Phanerochaete chrysosporium*, um fungo bastante estudado por sua capacidade de produção de ligninases, também mostrou atividade inferior às duas espécies referidas neste trabalho, (1,3 U/mL) em 5 dias em farelo de trigo, conforme apresentado por Fujian *et al.* (2001).

Com relação à Li-P, este fungos também demonstram as mesmas tendências de produção da Mn-P, apresentando atividades bem mais elevadas do que as apresentadas na literatura. Em cinco semanas de fermentação em farelo de trigo, foram obtidas 1264,8 U/mL por *G. striatum* e no mesmo substrato, *C. Byrsina* produziu 1121,0 U/mL, na quarta semana de fermentação,

valores superiores àqueles obtidos com *Phanerochaete chrysosporium* (2,7 U/mL) em fermentação, por 5 dias, em farelo de trigo (Fujian *et al.*, 2001).

No caso da lacase, houve uma super produção (41163,8 U/mL em fermentação por 4 semanas em farelo de trigo) por *C. byrsina*. Utilizando-se das mesmas condições inclusive a mesma metodologia (oxidação do 2,2"-azino-bis-etilbenthiazolina), Lang *et al.* (1998), observaram que *Pleurotus* sp produziu 0,38 U/mL em 4 semanas em fermentação de farelo de trigo. Um basidiomiceto bastante pesquisado, *Dichomitus squalens*, mostrou no mesmo trabalho, uma atividade também inferior a *C. byrsina* (0,1 U/mL em farelo de trigo durante 3 semanas de fermentação).

CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados podemos inferir que os microrganismo utilizados no presente trabalho, possuem excelente potencial para produção de ligninases. Entretanto, a comparação de obtenção de produtos por fermentação não é um procedimento totalmente seguro, visto que existem inúmeras variações de procedimentos adotados no processo fermentativo (fermentação sólida ou submersa) forma de extração da enzima, além das análises e expressão das atividades enzimáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, M.D, IRVINE, R.L. (1990) Characterization of reactions catalysed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chysosporum*. Arch. Biochem. Biophys., v. 276, p. 405-414.

BONONI, V. L. R (org.). (1999) Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, 184p.

BONONI, V. L. R. (1997) Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulósicos. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. ed. Microbiologia Ambiental, Embrapa-CNPMA, Jaguariúna. p .243-268.

BOURBONNAIS, R., PAICE, M. G. (1988) Veratrylic alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor*-caju. Biochem. J., v. 255, p. 445-450.

BUSWELL, J. A., CAI, Y., CHANG, S. (1995) Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. FEMS Microbiology Letters, v. 128, p. 81-88.

CHAGAS, E. P., DURRANT, L. R. (2001) Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosoporium* and *Pleurotus sajorcaju*. Enzyme and microbial technology, v. 29, p.473-477.

CLOETE, T.E., CELLIERS, L. (1999) Removal of Aroclor 1254 by the white rot fungus Coriolus vercicolor in the presence of different concentrations of Mn(IV)oxide. International Biodeterioration & Biodegradation., v. 44, p. 243-253.

CRAWFORD, D. L., POMETTO, A. L. (1988) Lignin-depolymerization activity of Streptomyces. In: WOOD, K., KELLOGG, S. T. Methods Enzymol., v. 161, p. 238-249.

DURÁN, N., ESPOSITO, E. (1997) Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos ligninolíticos. In: MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. ed. Microbiologia Ambiental, Embrapa-Jaguariúna. P. 269-292.

FUJIAN, X., HONGZHANG, C. & ZUOHU, L (2001). Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by Phanerochaete chrysosporium using steam-exploded straw as substrate. Bioresource Technology. v. 80, p. 149-151.

GLENN, J.K., AKILESWAREAN, L., GOLD, M.H. (1986) Mn(II) oxidation is the principle function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaetes chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys., v.251, p.688-696.

GOLD, M. H., WARIISH, J., VALLI, K. (1989) Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosoporium*. In: WHTAKER, J. R., SONNET, P. E. ed. Biocatalysis in Agricultural Biotechnology. Washington, American Chemical Siciety, p. 127-140.

GOLDSTEIN, I. S. (1976) Chemicals from Lignocellulose. Biotechnol. and Bioenginn. Symposium. v. 6, p. 293-301.

KUNZ, A., ZAMORA-PERALTA,P., MORAES, G. A.S. & DURÁN, N. (2002) Novas Tendências no Tratamento de Efluentes Têxteis. Quim. Nova, vol. 25, n. 1, p. 78-82.

LANG, E., NERUB, F. & ZADRAZIL, F. (1998) Production of ligninolytic enzymes by Pleurotus sp. And Dichomytus squalens in soil and lignocellulose substrate as influenced by soil microorganisms. FEMS Microbiology Letters. v. 167, p. 239-244.

LARS, H., GUNNAR, J., GÖRAN, P. JIEBING, L., PIERRE, L. & GUNNAR, H. (2000) Do the extracellular enzymes cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation? FEBS, v. 477, p. 79-83.

NÜSKE, J. SCHEIBNER, K., DORNBERGER, U., ULLRICH, R. & HOFRICHTER, M. (2002) Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. Enzyme and Microbial Technology. v. 30, p. 556-561.

TIEN, M., KIRK, K.T. (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaetes chrysosporium*. In: Wood, K., Kellogg, S. T. Methods Enzymol., v. 161, part B, p. 238-249.

WUBAH, D., AKIN, D., BORNEMAN, W. (1993) Biology, Fiber-Degradation and Enzymology of Anaerobic Zoosporic Fungi. Critical Rev. Microbiol., v. 19, p. 99-115.

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO DE ENZIMAS DESPOLIMERIZANTES DE MATERIAL VEGETAL COM APLICAÇÃO INDUSTRIAL:

Uso de resíduos agrícolas e agroindustriais para a produção de enzimas por processo fermentativo em estado sólido.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

INTRODUÇÃO

1- Biomassa e resíduos

Biomassa pode ter diversas definições, porém, no contexto da biotecnologia, é definida como toda matéria orgânica obtida pela conversão fotossintética. O carbono orgânico produzido anualmente por fotossíntese contém aproximadamente $3x10^{21}$J de energia, cerca de dez vezes mais que o consumo humano anual. A maior parte dessa biomassa (90%) aparece nas florestas, principalmente de regiões tropicais, enquanto aquela oriunda de cultivo agrícola corresponde a apenas 6% do carbono fixado da terra. (VACCARO et al., 2003; BONAN et al., 2003).

A biomassa vegetal possui a celulose como seu maior componente, a qual aparece embebida em uma matriz amorfa de lignina e hemicelulose, formando a lignocelulose que pode corresponder a mais de 90% do peso seco da célula vegetal de plantas terrestres vasculares. A quantidade de cada um dos polímeros constituintes da lignocelulose varia com a espécie, idade e parte da planta. Madeiras moles e duras possuem material lignocelulósico composto, em média, por 45% de celulose, 30% de hemicelulose e 25% de lignina. Em gramíneas, esse material apresenta a maior variação em sua composição sendo 25-40% de celulose, 25-50% de hemicelulose e 10-30 % de lignina.

Além do componente lignocelulósico, a pectina aparece como importante polímero constituinte da lamela média e parede primária da célula vegetal. A maioria das hortaliças apresenta 30% de celulose, 35% de pectina, 25% de xiloglicanas e 5% de arabinoglicanas, enquanto que os cereais possuem 30% de celulose, 5% de pectina, 30% de arabinoxilanas, 30% de glicanas mistas e 4% de xilogliganas (GLAZER; NIKAIDO, 1994; WOOD; KELLOG, 1988).

O consumo da biomassa disponível, em todo o mundo, gera grande quantidade de resíduos orgânicos como aqueles derivados da madeira (cavacos, pó-de-serra e folhas) além dos resíduos agrícolas e agro-industriais. Entre esses últimos, destacam-se, em volume de produção, a palha e farelo de trigo, casca e sabugo de milho, cascas de aveia e café, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de frutas e outros vegetais (casca, sementes e polpas) usados na indústria de alimentos (doces, polpas, sucos, etc). Além desses, outros, como papel, embalagens, restos de alimentos, etc, são gerados pelas atividades urbana e doméstica. Todos esses resíduos podem ser convertidos

unesp

em combustíveis ou proteínas, se submetidos a processos químicos e/ou biológicos (ILYN et al, 2004; SOCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Um dos resíduos agro-industriais gerados em maior volume no Brasil é o bagaço de cana-de-açúcar que representa o principal resíduo sólido de indústrias de açúcar e álcool. O "bagaço" como normalmente é chamado, é um material fibroso resultante da prensagem da cana para extração do suco e, geralmente, é usado na própria indústria para queima, visando geração de energia elétrica ou para aquecimento de caldeiras. A composição média de bagaço de cana-de-açúcar é de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Quimicamente, pode-se descrever sua composição como 50% de α-celulose, 30% de pentosanas e 2,5% de cinzas (PANDEY et al., 2000).

Vários processos têm sido descritos, nos quais o bagaço é usado para a produção de enzimas através de fermentação submersa, na qual o material é previamente hidrolisado ou pré-tratado (GUTIERREZ-CORREA et al., 1999; DE-PAULA et al., 1999; DOMINGUEZ et al., 1996). Entretanto, numerosos processos de fermentação em estado sólido (FES) têm sido desenvolvidos usando o bagaço como substrato, sendo, na maioria deles, como fonte de carbono para sustentar o crescimento microbiano visando a produção de enzimas extra-celulares (TENGERDY, 1996 ; MACHADO et al., 1996), embora tenha sido usado também como suporte inerte na produção dessas enzimas (SOLIS-PEREYRA et al. ,1993).

Muitos microrganismos possuem eficientes sistemas enzimáticos capazes de converter a lignocelulose presente no bagaço em metabólito essencial para seu crescimento. Esse complexo enzimático inclui celulases (endo-1,4-β-celulase- EC 3.2.1.4, exo-1,4-β-glicosidase -EC 3.2.1.74, exo-1,4-β-D-celobiohidrolase- EC 3.2.1.91 e β-glicosidase- EC 3.2.1.21), hemicelulases (β-1,4-D-endoxilanase- EC 3.2.1.8, Exo-1,4-β-xilosidase- EC 3.2.1.37, α-L-Arabinosidases- EC 3.2.1.55 e Acetil esterases- EC 3.1.1.6) e ligninases (lacases-EC 1.10.3.2, manganês peroxidase -MnP EC 1.11.1.13 e liginina peroxidases -LiP EC 1.11.1.14). Enzimas do grupo pectinolítico como pectina esterases (PE-EC 3.1.1.11), pectina lyase (Exo-PL- EC 4.2.2.9 e Endo-PL- EC 4.2.2.2) e poligalacturonase (ExoPG- EC 3.2.1.67 e Endo PG- EC 3.2.1.15) têm sido também produzidas quando indutores específicos são adicionados ao

unesp

bagaço (KANG et al., 2004; BLANCO et al, 1999; DA SILVA, 1997; FOGART, KELLY, 1983).

Grande número de microrganismos foi cultivado com sucesso em bagaço, como espécies de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus, Cephalosporium, Ceratocystis, Claviceps, Fusarium, Ganoderma, Gibberella, Neurospora, Phellinus, Phlebia, Pleurotus, Rhyzopus, Polyporus, Trichoderma;* leveduras dos gêneros *Candida, Pichia, Schwanniomyces, Kuehneromyces e* bactérias como *Acinetobacter, Brevibacterium, Cellulomonas, Clostridium, Klebsiella, Streptomyces e Xanthomonas* (PANDEY et al., 2000; ROS et al., 1993).

Um outro resíduo de importância no Brasil, em função do volume gerado e das características de composição, é o bagaço de laranja. Esse material, formado por casca, polpa e sementes, corresponde a 50% do peso da fruta fresca (GARZÓN; HOURS, 1992). Sua composição química média, corresponde a 11,8% de fibras, 6,4% de proteínas, 6,3% de nitrogênio, 6,7% de minerais (Ca, Mg, Fe, Mn, Co, Cu, Zn, P, K e Na), 19,4% de açúcares totais, 9,0% de açúcares redutores, 0,1% de pectina e 9,0% de umidade (RIZZATTO, 2004).

O Brasil processa cerca de 80 milhões de toneladas anuais de laranja e limão, gerando em torno de 30-40 milhões de toneladas de resíduo sólido. Esse material é peletizado após neutralização e desidratação com óxido de cálcio e, praticamente, todo exportado para países Europeus onde é usado como componente de ração (MARTIN et al, 2002; BARRETO et al., 1989).

A grande oferta desses resíduos e subprodutos agrícolas e agroindustriais e os problemas ambientais gerados por seu descarte direto, fez com que, nos últimos anos, fossem retomadas as pesquisas com o processo de fermentação em estado sólido, tendo em vista que esse processo é capaz de agregar valor a esses materiais, além de consumir pouca energia e produzir menos material residual. O uso dos resíduos vegetais como meios de cultivo para crescimento microbiano visando a obtenção de um produto de interesse comercial é um procedimento incluído na relação das tecnologias "limpas", de extrema importância no mundo atual (ILYIN et al., 2004).

unesp

Como exemplos dessas pesquisas podem ser citadas a deslignificação microbiana do material hemicelulósico para uso como ração animal (CHAUDHARY et al., 1994; ALANI et al., 1988), obtenção de composto para cultivo de cogumelos (PALOMO et al., 1999; BEAUX et al., 1996) ou em processo fermentação buscando a obtenção de produtos químicos e metabólitos como etanol (DORAN et al., 1994; NAVARRO et al. 1982); xilitol (FELIPE et al., 1997; DOMINGUEZ et al., 1996; FELIPE et al., 1996; GURGEL et al., 1995), alcalóides (HERNANDEZ et al, 1993), ácidos orgânicos (NAMPOOTHIRI ;PANDEY, 1996 ; SOCCOL et al., 1994; MANONMANI ; SREEKANTIAH, 1987) proteínas para enriquecimento de ração animal (single cell protein) (COLOMBATTO et al., 2003; ELSAYED et al., 1994; AZZAM, 1989) e enzimas (KANSOH et al., 1999).

O processo fermentativo semi-sólido para produção de enzimas, tem sido aplicado com sucesso, quer para enzimas bacterianas (SOARES et al., 1999) quer para enzimas fúngicas (MUKHEYEE; BANERJEE, 2004; ACUNÃ-ARGÜLES et al., 1995). Os substratos utilizados têm sido o farelo de trigo (SOUZA et al., 2003; CASTILHO et al.,1999 ; ALANÃ et al., 1990), polpa de maçã (HOURS et al., 1988; HANG ; WOODAMS, 1994), polpa de beterraba (SIDI et al., 1984), polpa de café (BOCCAS et al., 1994 ; ANTIER et al., 1993), polpa de cacau (SCHWAN et al., 1997), casca ou bagaço de laranja (FONSECA ; SAID, 1994; GARZÓN; HOURS, 1992; LARIOS et al., 1989), bagaço de cana (ACUNÃ-ARGÜELLES et al., 1994) entre outros.

Resíduos ricos em pectina como aqueles derivados de frutas e hortaliças e farelo de trigo são indutores naturais das pectinases, além de suprirem as necessidades básicas de fonte de carbono prontamente assimilável e de nutrientes para o início do desenvolvimento microbiano, ou seja, o crescimento basal para iniciar a hidrólise enzimática dos polímeros constituintes do resíduo (MIKAHAILOVA et al., 1994). Esses resíduos, combinados ao bagaço de cana como suporte, podem constituir ótimo substrato para o crescimento microbiano e a produção de pectinases visto que as fibras do bagaço evitam a compactação do substrato, permitindo a uma mais eficiente a aeração do meio (HUERTA et al., 1994 ; ACUNÃ-ARGÜELES et al. ,1994).

unesp

2-Fermentação em estado sólido (FES)

Fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como um processo que ocorre na ausência ou próximo da ausência de líquido no espaço entre as partículas (LONSANE et al., 1985). A água, nesse sistema, está contida no substrato, cuja capacidade de retenção de líquido varia com o tipo de material. Fibras de celulose, por exemplo, são capazes de reter 10g de água por grama de matéria seca. Na fermentação submersa (FSM), ao contrário, os nutrientes e microrganismos estão submersos em água (GRIGELMO-MIGEUL; MARTIN-BELLOSO, 1999).

O crescimento e metabolismo microbianos sempre ou quase sempre, ocorrem na fase aquosa, assim como, a difusão dos solutos e/ou substratos. A troca gasosa, por sua vez, pode ocorrer tanto na fase líquida quanto na fase gasosa. Na fermentação em estado sólido, a fase líquida é representada pelo filme aquoso que fica ao redor das células, enquanto o espaço entre as partículas é ocupado pela fase gasosa. Portanto, a substituição da fase líquida pela gasosa aumenta a transferência de oxigênio, porém, impede a difusão de solutos e dos substratos e interferem sobremaneira no desenvolvimento do microrganismo (GERVAIS et al., 1996).

As três fases, sólida, líquida e gasosa, estão presentes no meio líquido e no sólido, mas não na mesma proporção e, portanto, a cinética de difusão e as características reológicas e termodinâmicas (a_w, pressão osmótica) são diferentes. Ainda, no processo sólido, a proporção de cada fase depende do tipo de substrato usado. Entretanto, a maior diferença entre fermentação em meio sólido e fermentação em meio líquido, está no fato de que, nesta última, a mistura entre os componentes do processo (microrganismos, nutrientes e metabólitos) é homogênea e uniformemente distribuída em todo o fermentador. Essa mistura perfeita evita a formação de camadas diferenciadas ao redor da célula microbiana, que limitam o fenômeno de difusão de nutrientes e metabólitos e a troca gasosa que afetam o desenvolvimento do microrganismo. Nesse sentido, o meio sólido deve ser considerado um meio heterogêneo em termos de população microbiana e concentração de solutos (GRIFFIN, 1981).

Quanto maior for a heterogeneidade da mistura na fermentação sólida, menos precisos são os resultados. Para reduzir essa heterogeneidade pode-

unesp

se usar sistema com misturador, microrganismos com maior capacidade de expansão do crescimento no substrato, como fungos filamentosos e a aeração forçada para remover o CO_2, dissipar calor e distribuir a umidade (GERVAIS; MOLIN, 2003).

Os fungos têm sido considerados os organismos mais adaptados à FES em função da capacidade de suas hifas de crescer na superfície da partícula e por penetrarem nos espaços interpartículas colonizando os substratos sólidos (SANTOS et al., 2004). Porém, vários trabalhos têm mostrado resultados muito satisfatórios de obtenção de diferentes produtos por FES utilizando culturas bacterianas (KASHYAP et al., 2003; KAPOOR et al., 2000; CAO et al., 2000;SOARES et al., 1999).

Na FES, o material sólido usado pode servir, ao mesmo tempo, de suporte físico e como fonte de carbono e nutrientes para sustentar o crescimento microbiano ou somente com um suporte físico inerte ao qual são adicionadas a solução de nutrientes e a fonte de carbono. Esse material sólido geralmente é um composto natural constituído de subprodutos e resíduos agrícolas e agroindustriais, resíduos de atividade urbana, etc, ou material sintético (PANDEY, 2003).

Entre os fatores característicos da FES, a baixa atividade de água do meio sólido é o que mais influencia todos os aspectos da fisiologia do microrganismo, como crescimento vegetativo, esporulação e germinação de esporos, além da produção de metabolitos, produção e atividade de enzimas.

Fungos crescendo em FES, com baixa a_w tendem a acumular em suas células, poliols como glicerol, manitol, eritrol e arabitol. A composição do "pool" de poliols depende da condição de crescimento e representa uma adaptação às condições de baixa umidade em FES, de modo a manter a pressão de turgor das células. Esses compostos são secretados pelo micélio e constituem o conjunto de metabolitos presente no material fermentado (HOLKER et al., 2004).

Uma outra classe de metabolitos gerada em FES são os ácidos orgânicos. O fungo *A. niger* é um potente produtor de ácido cítrico, cuja produção chega 1g por Kg de substrato, enquanto *A. oryzae* produz ácido oxálico, embora em menor proporção (BIESEBEKE et al., 2002).

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

A expressão diferenciada de proteínas em FES tem sido estudada (AGUILAR et al., 2004). A glucoamilase B (glaB) de *A. oryzae* é altamente induzida durante a fermentação do Koji em FES, porém, não é encontrada em FSM. Estudos moleculares revelaram que a região GC-box é o elemento-cis do promotor e responsável pela expressão da enzima em condições de baixo a_w, alta temperatura e na presença de barreiras físicas à expansão das hifas (ISHIDA et al., 2000; ISHIDA et al, 1998). Foram também identificadas duas proteases que somente são expressadas em FES (BIESEBEKE et al., 2002).

A produção de enzimas extracelulares por *Trichoderma viridae* foi fortemente afetada pelo a_w. A produção máxima de poligalacturonase e xilanase ocorreu a a_w de 0,99, enquanto que a síntese de β-glucosidase foi aumentada em a_w de 0,96 a 0,98 (GRAJEK, GERVAIS, 1987).

Em FES, outro fator a ser considerado é a aeração, a qual tem várias funções: a oxigenação, a remoção do CO_2, a dispersão do calor (regulando a temperatura do meio), a distribuição do vapor d'água (regulando a umidade) e a distribuição de componentes voláteis produzidos durante o metabolismo. A taxa de aeração depende da porosidade do meio e as $_pO_2$ e $_pCO_2$ devem ser otimizadas para cada tipo de meio, microrganismo e processo (CHAHAL, 1987). A produção de compostos de "flavor", que é uma característica da FES, é relacionada com a baixa disponibilidade de oxigênio no meio, resultando na produção de compostos de cheiro como álcoois, aldeídos e cetonas (FERON et al., 1996).

A temperatura está diretamente relacionada com o a_w e a aeração. Uma grande limitação da FES é a dificuldade de remoção do excesso de calor gerado pelo metabolismo do microrganismo, devido à baixa condutividade térmica do meio sólido. Na prática, a FES requer a aeração como veículo de dissipação de calor, muito mais do que para suprimento de O_2 (VIESTURS et al., 1981). O aumento da temperatura num biorreator provoca a desnaturação do produto, principalmente de substâncias termolábeis (SANTOS et al., 2004).

Apesar dos problemas de condução da fermentação em meio sólido, cujos principais pontos foram destacados, inúmeras vantagens desse processo em relação à fermentação em meio líquido são levantadas (HOLKER et al., 2004).

unesp

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

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

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

Ainda, propriedades intrínsicas das moléculas de proteínas extracelulares microbianas como temperatura e pH ótimos para a atividade, termoestabilidade, estabilidade em diferentes faixas de pH e afinidade pelo substrato, em muitos casos, também mostram ser influenciadas pelo tipo de processo fermentativo usado para a produção das mesmas (ALAZARD ; RAIMBAULT, 1981).

Acunã-Argüelles *et al* (1995) compararam as propriedades de endo e exo-PG produzidas por *Aspergillus niger* em FES e FSM. Os resultados revelaram que houve diferenças na estabilidade a diferentes valores de pH e

unesp

temperatura e nas taxas de afinidade pelo substrato. Quando expostas a 60ºC por 30 minutos, a endo e exo-PG de origem em FES mantiveram cerca de 90 e 70% da atividade original, enquanto que aquelas obtidas por FSM mantiveram apenas 40% da atividade. A endo-PG mostrou-se estável na faixa de pH entre 2,6 a 6,0 quando produzida por FES e entre 6,0 e 7,0 quando produzida por FSM. A exo-PG obtida por FES foi estável entre 3,5 e 5,0 e entre 4,0 e 5,0 quando obtida por FSM. A endo-PG produzida por FSM mostrou uma maior afinidade pelo substrato, enquanto que a exo-PG não mostrou diferenças nesta propriedade quando produzida nos dois processos fermentativos.

Vários autores têm também relatado uma menor produção de protease em FES, durante estudos de obtenção de outras enzimas por esse processo meio (BATTAGLINO et al., 1991; AURIA et al., 1990). A presença de proteases no meio fermentado tem sido associada ao decaimento maior da atividade da enzima alvo do processo fermentativo, em meio líquido, refletindo na menor produtividade obtida nesse meio (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003).

3- **Conclusões, perspectivas de problemas a serem resolvidos e relação com a linha de pesquisa desenvolvida.**

A economia brasileira está baseada na produção agrícola, tendo como principais produtos, em relação a valores no mercado internacional, a soja e outros grãos, a cana-de-açúcar, o café, mandioca e frutas. Além do comércio de produtos agrícolas "in natura", o setor agroindustrial, com o processamento de sucos de frutas e produção de álcool e açúcar, tem se posicionado como uma importante fonte de exportação do país. Essas atividades geram milhares de toneladas de subprodutos como o bagaço de cana e o bagaço de laranja. Além desses materiais, resíduos de produtos agrícolas como casca de frutas, farelo de trigo, palha e sabugo de milho, etc, são gerados em grande quantidade, sem nenhum valor agregado e geram problemas ambientais no descarte.

Em função da grande disponibilidade desses resíduos e da perspectiva de aumentar ou atribuir valor aos mesmos, possibilitando uma fonte de renda alternativa para propriedades rurais, o grupo optou por utilizá-los como

unesp

substratos para a produção de enzimas, através da fermentação em estado sólido. Diversos resíduos e subprodutos agrícolas foram pesquisados como meios de cultivo para crescimento de fungos e bactérias, visando a produção de pectinases, xilanases, celulases e ligninases, em FES, utilizando cepas microbianas isoladas da nossa microbiota. Ainda, foram realizados estudos comparativos das propriedades das enzimas (na forma bruta) produzidas por FES e FSM, cujos resultados são apresentados nos artigos a seguir.

REFERENCES

ACUÑA-ARGÜELLES, M. E.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES; E. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 43, p. 808-814, 1995.

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

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

ALAÑA, A.; ALKORTA, I.; DOMÍNGUEZ, J.B.; LLAMA, M.J.; SERRA, J.L. Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. **Appl. Environm. Microbiol.** v. 56, n. 12, p. 3755-3759, 1990.

ALANI, F., SMITH, J. E. Effect of chemical pretreatment on the fermentation and ultimate digestibility of bagasse by *Phanerochaete chrysosporium.* **J. Sc. Food Agricult.**, v. 42, p. 19-28, 1988.

ALAZARD, D.; RAIMBAULT, M. Comparative study of amylolytic enzyme production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state fermentation. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 12, p. 113-117, 1981.

ANTIER, P., MINJARES, A., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALES, G. Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid state fermentation of coffee pulp**. Enzyme Microb. Technol.**, v. 15, p. 254-260, 1993.

AURIA, R.; HERNÁNDEZ, S.; RAIMBAULT, M.; REVAH, S. Ion exchange resin: a model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Tech.**, v.4, p.391-396, 1990.

AZZAM, A. M. Pre-treatment of agrocellulosic waste for microbial biomass production with a defined mixed culture. **J. Environm. Sc. Health,** v. B 27, p. 1643-1654, 1989.

BARRETO DE MENEZES, T.J.; SALVA, T.J.G.; BALDINI, V.L.; PAPINI, R.S.; SALES, A.M. Protein enrichment of citrus wastes by solid substrate fermentation. **Proc. Biochem.**, v.24, p.167-171, 1989.

BATTAGLINO, M.; HERGO, M.; PILOSOF, A.M.R.; BARTHOLOMAI, G.B. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.35, p.292-296, 1991.

BEAUX, M. R., SOCCOL, C. R., MARIN, B., TONIAL, T., ROUSSOS, S. Cultivation of *Lentinus edodes* on mixture of cassava and sugarcane bagasse. In: Roussos, S., Lonsane, B. K., Raimbault, M., Viniegra-Gonzales, G. (Eds.). **Advances in Solid State Fermentation.,** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 499-511, 1996.

BIESEBEKE, R., RUIJTER, G.; RAHARDJO, Y.; HOOGSCHAGEN, M.J.; HEERIKHUISEN, M.; LEVIN, A.; HONDEL, K.; RONZEMA, A.; PUNT, P.J. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentation. Progress report on a multi-disciplinary project. **FEMS Yeast Res.**, v.2, p.245-248, 2002.

BLANCO, P., SIEIRO, C., VILLA, T. G. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 175, p. 1-9, 1999.

BOCCAS, F., ROUSSOS, S., GUTIERREZ, M., SERRANO, L., VINIEGRA, G. G. Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique**. J. Food Sci. Technol.**, v. 31, p. 22-26, 1994.

BONAN, G.B.; LUIS, S.; SITCH., S. Adynamic global vegetation model for use with climate models: Concepts and description of simulated vegetation dynamics. **Global Chang Biol.**, v.9. p.1543-1566, 2003.

CAO, J.; SUN, W.; PAN, Y.; CHEN, S. High-producers of poligalacturonase selected from mutants resistant to rifampin in alkalophilic *Bacillus* sp NTT33. **Enzyme Microb. Technol.**, v.27, p.545-548, 2000.

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

unesp

CHAHAL, D.S. Growth characteristics in solid state fermentation for upgrading of protein values of lignocelluloses and cellulases production. **Am. Chem. Soc. Symp. Ser.**, v.207, p.421-442, 1987.

CHAUDHARY, L. C., SINGH, R., KAMRA, D. N. Biodelignification of sugar cane bagasse by *Pleurotus florida* and *Pleurotus cornucopiae.* **Indian J. Microbiol.**, v. 34, p. 55-57, 1994.

COLOMBATTO, D.; MOULD, F.L.; BHAT, M.K. Use of fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets. A biochemical and in vitro rumem degradation assessment. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.107, p.201-209, 2003.

DA SILVA, R., FRANCO, C. M. L., GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. **Bol. Soc. Brasileira Ciência Tecnol. Alimentos**, v. 31, p. 249-260, 1997.

DE-PAULA, E. H., RAMOS, L. P., AZEVEDO, M. O. The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. **Biores. Technol.,** v 68, p. 35-41, 1999.

DOMINGUEZ, J. M., GONG, C. S., TSAO, G. T. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, p. 57-58, 49-56, 1996.

DORAN, J. B., ALDRICH, H. C., INGRAM, L. O. Saccharification and fermentation of sugarcane bagasse. **Biotechnol. Bioengin.** v. 44, p. 240-247, 1994.

ELSAYED, S. A., ZAKI, M. T., ABOUELKHAIR, A. W. Bioconversion of sugarcane bagasse into a protein rich product by white-rot fungus. **Res. Cons. Rec**, v. 12, p. 195-200, 1994.

FELIPE, M. G. A., VITALO, M., MANCILHA, I. M. Xylitol formation by *Candida guilliermondii* grown in a sugar cane bagasse hydrolysate- effect of aeration and inoculum adaptation. **Acta Biotechnol.**, v. 16, p. 73-79, 1996.

FELIPE, M. G. A., VITALO, M., MANCILHA, I. M., SILVA, S. S. Fermentation of sugarcane hemicellulose hydrolysate for xylitol production. Effect of pH. **Biomass Bioen.**, v. 30, p. 11-14, 1997.

FERON, G.; BONNANME, P.; DURAND, A. Prospects for the microbial production of food flavours. **Trends Food Sci. Technol**., v.7, p.285-293, 1996.

FOGART, W.M.; KELLY, C.T. Pectic enzymes. In: FOGARTY, W.M. (ed) **Microb. Enz. Biotechnol.**, Applied Science Publishers, London, 1983. p.131-181.

FONSECA, M.J.V.; SAID, S. The pectinase produced by *Tubercularia vulgaris* in submerged culture using pectin or orange-pulp pellets as inducer. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 42, p. 32-35, 1994.

GARZÓN, C. G., HOURS, R. A. Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. **Biores. Technol.,** v. 39, p. 93-95, 1992.

GERVAIS, P.; MARRCHAL, P.A.; MOLIN, P. Water relations of solid state fermentation. **J.Sci. Ind. Res**., v.55, p.343-357, 1996.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J**., v.13, p.85-101, 2003.

GLAZER, A. N., NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology**. New York: W. H. Freeman and Company, 1994. p. 328-329.

GRAJEK, W.; GERVAIS, P. Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activity produced by *Trichodema viride* TS in solid-state fermentation. **Enzyme Microb. Technol**., v.9, p.658-662, 1987.

GRIGELMO-MIGEUL, N.; MARTIN-BELLOSO, O. Characterization of dietary fiber from orange juice extraction. **Food Res. Int**., v.31, p.355-361, 1999.

GRIFFIN, D.M. Water and microbial stress. **Adv. Microb. Ecol**., v.5, p.91-136, 1981.

GURGEL, P. V., MANCILHA, I. M., PECANHA, R. P., SIQUEIRA, J. F. M. Xylitol recovery from fermented sugarcane bagasse hydrolysate. **Biores. Technol.**, v. 52, p. 219-223, 1995.

GUTIERREZ –CORREA, M., PORTAL, L., MORENO, P., TENGERDY, R. P. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. **Biores. Technol.**, v. 68, p. 173-178, 1999.

HANG, Y. D., WOODAMS, E. E. Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. **Lebensm.-Wiss.Technol.**, v. 27, p. 194-196, 1994.

HERNANDEZ, M. R. T., LONSANE, B. K., RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S. Spectra of ergot alkaloids produced by *Claviceps purpurea* in solid state-system- influence of the composition of liquid medium used for impregnating sugar cane bagasse. **Proc. Biochem.**, v. 28, p. 23-27, 1993.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol**., v.64, p.175-186, 2004.

HOURS, R. A., VOGET, C. E., ERTOLA, R. J. Some factors affecting pectinase production from apple pomace in solid states cultures. **Biol. Wastes**, v. 24, p. 147-157, 1988.

HUERTA, S., FAVELA, E., LOPEZ-ULIBARRI, R., FONSECAS, A., VINIEGRA-GONZALES, G., GUTIERREZ-ROJAS, M. Adsorbed substrate fermentation for pectinase production with *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Technol.**, v. 8, p. 837-842, 1994.

ILYIN, V.K.; SMIRNOV, L.A.; SOLDATOV, P.E.; KORNUISHENKOVA, I.N. Microbial utilization of natural organic wastes. **Acta Astron**., v.54, p.357-361, 2004.

ISHIDA, H.; HATA, Y.; ICHIKAWA, A.; KAWATO, A.; SUGINAMI, K.; IMAYASY, S. Regulation of the glucoamylase encoding gene (*gla*B), expressed in solid-state fermentation culture (koji) of *Aspergillus oryzae*. **J Ferment**., v.86, p.301-307, 1998.

ISHIDA, H.; HATA, Y.; KAWATO, A.; ABE, Y.; SUGINAMI, K.; IMAYASY, S. Identification of functional elements that regulate the glucoamylase encoding gene (*gla*B), expressed in solid-state fermentation culture (koji) of *Aspergillus oryzae*. **Curr. Genet**., v.37, p.373-379, 2000.

KANG, S.W.; PARK, Y.S.; LEE, J.I. Production of cellulose and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Biores. Technol.**, v.91, p.153-156, 2004.

KANSOH, A. L., ESSAM, S. A., ZEINAT, A. N. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesie*. **Polymer Degradat. StaB.**, v. 63, p. 273-278, 1999.

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

KASHYAP, D. R.; SONI, S.K.; TEWARI, R. Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp DT7 using solid state fermentation. **Biores. Technol.**, v.88, p.251-254, 2003.

LARIOS, G.; GARCIA, J.M.; HUITRON, C. Endo-polygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. **Biotechnol Lett,** v. 11, p. 729-734, 1989.

LONSANE, B.K.; GHILDYAL, N.P.; BUTIATMAN, S.; RAMAKRISHMA, S.V. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme Microb. Technol.**, v.7, p.258-265, 1985.

MACHADO, K. M. G., SILVA, W. R. F., BONONI, V. L. R. Screeninig of ligninolytic fungi for soil remediation. II-Production of peroxidases and phenol oxidases. **Intern. Biodeter. Biodeg.**, v. 37, p. 130, 1996.

MANONMANI, H. K., SREEKANTIAH, K. R. Studies on the conversion of cellulase hydrolysate into citric acid by *Aspergillus niger*. **Proc. Biochem.**, v. 22, p. 92-94, 1987.

MARTIN, E.S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Proc. Biochem.**, v.37, p.949-954, 2002.

MIKHAILOVA, R. V., SAPUNOVA, L. L., LOBANOK, A. G. Biosynthesis of pectinlyases in *Penicillium adametzzi, P citrinum and P. janthinellum*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 10, p. 457-461, 1994.

MUKHEYEE, G.; BANERJEE, R. Biosynthesis of tanase and gallic acid from tannin rich substrate by *Rhyzopus oryzae* and *Aspergillus foedidus*. **J. Basic Microb**., v.44, p.42-48, 2004.

NAMPOOTHIRI, K. M., PANDEY, A. Solid state fermentation for L-glutamic acid production using *Brevibacterium* sp. **Biotechnol. Lett.**, v. 18, p. 199-204, 1996.

NAVARRO, A. R., LUCCA, M. E., CALLIERI, D. A. S. Continuous production of ethanol by yeast cells immobilized on sugarcane bagasse pith. **Acta Cient Venez**, v. 33, p. 214-218, 1982.

PALOMO, A., DOOR, C., MATTOS, L., Estudo comparativo de diferentes substratos para el crescimento y produccion de *Lentinus edodes* Berk. Singer ("SHIITAKE"). **Fitopatologia**, v. 33, p. 71-75, 1999.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugar cane bagasse. **Biores. Technol.**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J**., v.13, p.81-84, 2003.

RIZZATTO, M.L. **Estudo da Produção de Pectinases em Reator de Coluna por Fermentação Semi-sólida de Bagaço de Laranja Industrializado**, Campinas, UNICAMP/FEA, Doutorado, 2004. 209pp.

ROS, J.M.; SAURA, D.; SALMERÓN, M.C.; LAENCINA, J. Production of pectic enzymes from *Rhizopus nigricans* cultures with different sources of carbon. **Ann. Microbiol. Enzimol.** v. 43, p.71-76, 1993.

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

SCHWAN, R. F., COOPER, R. M., WHEALS,A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 21, p. 234-244, 1997.

SIDI, A., COCHET, N., GHOSE, T .K., LEBEAULT, J. M. Enzymatic hydrolysis of sugar beet pulp. **Biotechnol. Lett.**, v. 6, p. 723-728, 1984.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

SOARES, M. M. C. N. **Isolamento de linhagens microbianas produtoras de pectinases e caracterização das enzimas**. Unesp, Rio Claro. Tese de Mestrado, 1999.

SOCCOL, C.R., MARIN, B. , RAIMBAULT, M. , LEBEAULT, J.M. Potential of solid state-state fermentation for production of l(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. **Appl. Bichem. Biotechnol**., v.41, p.286-290, 1994.

SOCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochem. Eng, J**., v.13, p.205-218, 2003.

SOLIS-PEREYRA, S., FAVELA-TORRES, E., GUTIERREZ-ROJAS, M., ROUSSOS, S., SAUCEDO-CASTANEDA, G., GUNASEKARAN, P., VINIEGRA-GONZALES, G. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinases by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.,** v. 39, p. 36-41, 1993.

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

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

TENGERDY, R. P. Cellulase production by solid state fermentation. **J. Sci. Indust. Res**., v. 55, p. 313-316, 1996.

VACCARO, S.; ARTURI. M.F.; GOYA, J.F.; FRANGI, J.L. PICCOLO, G. Carbon storage in secondary successional stages in the province of Misiones, Argentina. **Interciencia**, v.28, 521-525, 2003.

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

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

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

WOOD , W. A. ; KELLOG, S.T. Linin, pectin and chitin. In: **Methods Enzymol.**, Academic Press, London, v.161, part B, 1988.

PECTINASE PRODUCTION BY *PENICILLIUM VIRIDICATUM* RFC3 BY SOLID STATE FERMENTATION USING AGRICULTURAL WASTES AND AGRO-INDUSTRIAL BY-PRODUCTS

Dênis Silva; Eduardo da Silva Martins; Roberto da Silva; Eleni Gomes*

Laboratório de Bioquímica e Microbiologia, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Submitted: September 13, 2002; Returned to authors for corrections: January 08, 2002; Approved: December 05, 2002

ABSTRACT

Pectin lyase and polygalacturonase production by newly isolated *Penicillium viridicatum* strain Rfc3 was carried out by means of solid state fermentation using orange bagasse, corn tegument, wheat bran and mango and banana peels as carbon sources. The maximal activity value of polygalacturonase (Pg) (30U.g^{-1}) was obtained using wheat bran as carbon source while maximal pectin lyase (Pl) (2000 U.g^{-1}) activity value was obtained in medium composed of orange bagasse. Mixtures of banana or mango peels with sugar cane bagasse resulted in increased Pg and Pl production compared to fermentations in which this residue was not used. The mixture of orange bagasse and wheat bran (50%) increased the production of Pg and Pl to 55 U.g^{-1} and 3540 U.g^{-1} respectively. Fractions of Pg and Pl, isolated by gel filtration in Sephadex G50, presented optimum activity at pH 5.0 and 10.5 respectively. Maximal activity of Pg and Pl fractions was determined at 55°C and 50°C respectively. Pg was stable in neutral pH range and at 40°C whereas Pl was stable in acidic pH and at 35°C, for 1 h.

Key words: *Penicillium viridicatum*, polygalacturonase, pectin lyase, wastes, by-product

INTRODUCTION

A large number of microorganisms, isolated from different materials, have been screened for their ability to degrade polysaccharides present in biomass, producing protein or higher value products (7,29,39).

Among depolimerizing microbial enzymes, pectinolytic enzymes, which degrade pectin present in varying abundance in the middle lamella and primary cell walls, have great commercial importance for various industrial applications like improving juice yields and clarity (3,12). The use of liquefying enzymes for mash treatment results in improvement of juice flow, leading to a shorter press-time, without the necessity for pressing aids (35). At the same time, pectin is broken down to such an extent that the viscosity of mash is reduced (28). Other areas of application include the paper and pulp industry (36), waste management (13), animal feed (6) textile industry (4).

Pectinolytic enzymes are classified according to their mode of attack on the galacturonan part of the pectin molecule. They can be distinguished from pectin methylesterases (EC 3.1.11.1), that deesterify pectins to low methoxyl pectins or pectic acid, and form pectin depolymerases, that split the glycosidic linkages between galacturonosyl (methyl ester) residues. Polygalacturonases split glycosidic linkages next to free carboxyl groups by hydrolysis while pectate lyases split glycosidic linkages next to free carboxyl groups by β-elimination. Both endo types of Pgs and PALs (EC 3.2.1.15 and EC 4.2.2.2, respectively) are known to randomly split the pectin chain. Exo-Pgs (EC 3.2.1.67) release monomers or dimmers from the non-reducing end of the chain, whereas exo-PALs (EC 4.2.2.9) release unsaturated dimmers from the reducing end. Highly methylated pectins are degraded by endo-pectin lyases (Pl; EC 4.2.2.10) and also by a combination of pectin esterases with Pg or PAl (10,34).

Major impediments to the exploitation of commercial enzymes are their yield, stability, specificity and the cost of production. New enzymes for use in commercial applications with desirable biochemical and physico-chemical characteristics and a low cost of production have been the focus of much research.

* Corresponding author. Mailing address: Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biologia, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil. Tel.: (+5517) 221-2393. Fax: (+5517) 221-2390. E-mail: eleni@bio.ibilce.unesp.br

Application of agro-industrial wastes as carbon sources in enzyme production processes reduces the cost of production, and also helps in solving problems with their disposal (33).

In this paper we report the production of pectolytic enzymes by a newly isolated strain of *Penicillium viridicatum* Rfc3 by solid-state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. Some physico-chemical characteristics of the enzymes fractions are presented.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism

The *Penicillium vericatum* Rfc 3 strain used in this study was recently isolated from decaying vegetable collected in Bady Bassit-SP/Brazil. The strain was maintained on potato dextrose agar (PDA) slopes as a stock culture.

Media, cultivation of microorganism and enzyme production

The solid substrates were prepared as follows:

a) Orange bagasse. The pellet of orange bagasse (pressed mixture of pulp and peel) was provided by Citrovita Agro-industrial Ltda/Catanduva/SP/Brazil. Chemical analysis indicated that the dry material was composed of 11.8% fiber, 6.4% protein, 63.0% nitrogen, 6.7% ash, 19.0% total sugar (9.0% reducing sugar) and 0.1% pectin. The material was ground and particles sieved by a Bender USS 230 strainer and dried at 80°C.

b) Sugar cane bagasse: The sugar cane bagasse was provided by Usina de Açúcar e Álcool São Domingos/Catanduva/SP/Brazil. Chemical analysis indicated that the dry material was composed of 75.0% fiber, 0.5% protein, 5.0% nitrogen, 3.4% ash, 10.4% total sugar (3.5% reducing sugar).The material was ground and particles sieved by a Bender USS 230 strainer and dried at 80°C.

c) Wheat bran: This material was purchased from the local market, dried and used untreated. Chemical analysis indicated that the dry material was composed of 8.1% fiber, 15.7% protein, 65.0% nitrogen, 4.6% ash, 16.7% total sugar (5.2% reducing sugar).

d) Banana and mango were purchased from the local market. The peels were removed, dried and ground to about 2 mm in particle size. The total and reducing sugar contents in banana peel were 26.2% and 13.2%, respectively and in mango peel were 39.3% and 19.5%, respectively. No other chemical analyses were performed. The dried peels were not submitted to any chemical treatment.

e) Corn teguments were supplied by Laboratório de Cereais/Departamento de Engenharia de Alimentos IBILCE/UNESP/São José do Rio Preto/SP/Brasil, as a residue from corn processing. The total and reducing sugar content were 10.4% and 3.5%, respectively. No other chemical analyses were performed.

Solid-state fermentation (SSF) was carried out using a 250 ml Erlenmeyer flask containing 5g of sterilized substrate (120°C/40min) inoculated with 10 ml aliquots of conidia suspension (approx. 10^7 spores/g dry substrate) obtained from a 7-day agar slant culture suspended in sterile Tween 80 solution. After inoculation, 10 ml of nutrient solution, composed of 0.1% NH_4NO_3; 0.1% $NH_4H_2PO_4$; 0.1% $MgSO_4 x\ 7H_2O$, was added to each flask. The final moisture content of the medium was approximately 67%. The substrates were mixed in proportions of 50%.

The cultivation was carried out at 30°C for 14 days. At 48h intervals, the solid fermented material corresponding to one Erlenmeyer flask was mixed with 40 ml distilled water, stirred for 40 min, filtered under vacuum and centrifuged. The supernatant was used as crude enzyme solution.

Enzyme activity measurements

Polygalacturonase (Pg) activity was determined by measuring the release of reducing groups from citrus pectin using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent assay (25). The reaction mixture containing 0.8 ml 1% citric pectin 67% methoxylated (Braspectina-Limeira/SP/Br) in 0.2M acetate buffer, pH 5.0 and 0.2 ml of crude enzyme solution, was incubated at 50°C for 10 min. One unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme which releases one mmol of galacturonic acid per minute.

Pectin lyase (Pl) activity was determined by measuring the increase in absorbance at 235 nm of substrate solution (0.8 ml 1% citric pectin in 0.2M tris-HCl buffer, pH 8.5) hydrolyzed by 0.2 ml enzyme solution, at 50°C. One unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme which releases 1 µmol of unsaturated uronide per minute, based on the molar extinction coefficient (ε=5500) of the unsaturated products (2).

The enzyme production was expressed in units per gram of initial dry solid substrate ($U.g^{-1}$).

Separation of the pectinases

The crude enzyme (300 ml), obtained after 2 and 14 cultivation days on orange bagasse and wheat bran mixture (50% w/w), was slowly dispersed in two volumes of iced ethanol and maintained at -20°C for 2 hours. The resulting precipitate was collected by centrifugation (20.000xg for 20 min), dissolved in the smallest possible volume of tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4) and applied to a Sephadex G 50 column (3 x 100cm) equilibrated with 50 mM tris-HCl buffer (pH 7.4). The enzymes were eluted with the same buffer.

Enzyme characterization

The fractions of Pg and Pl, obtained from gel filtration, were used for the characterization assays.

Optimum pH and temperature for enzyme activity: The enzyme activity was determined at 50°C, in different pH using sodium

acetate (pH 3.0-5.0), citrate-phosphate (pH 5.0-7.0), tris-HCl (pH 7.0-8.5) and glycine-NaOH (pH 8.5-11.0) as buffers. The optimum temperature within the 30-70°C range was determined by incubation of the reaction mixture at optimum pH.

pH and temperature stability: Enzyme solution was dispersed (1:1) in 0.2M buffer pH 3.0-5.0 (sodium acetate), pH 5.0-7.0 (citrate-phosphate), pH 7.0-8.5 (tris-HCl) and pH 8.5-11.0 (glycine-NaOH) and maintained at 25°C for 24h. An aliquot was used to determine the remaining activity at the optimum pH and temperature for enzymes. For the temperature stability determination, the enzyme solution was incubated at different temperatures (30°C - 70°C) for 1h at pH 5.0. An aliquot was withdrawn and placed on ice before assaying for residual pectinase activity at optimum pH and temperature.

RESULTS AND DISCUSSION

Production of pectinases by SSF

The fungus *Penicillium viridicatum* Rfc3, when grown in a media containing wheat bran, orange bagasse, corn tegument, banana and mango peels or mixture of these materials with sugar cane bagasse (50% w/w) produced polygalacturonase and pectin lyase. Enzyme production by SSF was analyzed during 14 days and the experiments were carried out in five assays (Table 1). Polygalacturonase production peaked between the 4th and the 6th days of cultivation when the substrates contained no sugar cane bagasse. In media composed of orange bagasse, wheat bran and corn tegument, a first peak was obtained after the 4th of fermentation and a second and smaller peak, at the 12th day (data not shown). The maximal activity value of Pg (30U.g^{-1}) was obtained using wheat bran as carbon source.

Pl production in media composed by only one type of waste was observed in the beginning of fermentation and peaks of production occurred between the 2th and the10th days. The maximal Pl activity value was obtained in media composed of orange bagasse (2000 U.g^{-1}) (Table 1).

Mixtures of high sugar content wastes such as banana (13.2%) and mango (19.5%) peels with sugar cane bagasse resulted in increase in the Pg and Pl production compared to fermentations in which the bagasse was not used (Table 1). It is known that the synthesis of pectinases by fungi is subject to catabolic repression by high free sugar concentration affecting inducible and constitutive enzymes (1,19). On the other hand, the consistence and size of particles in media composed of banana and mango peels interfered in their packing during the fermentation, since the bed remained static (nonmixed system), affecting the gas and heat exchange within the system (27). The addition of fibrous material as sugar cane bagasse increased the interparticle spacing, possibly increasing the aeration and diffusion of nutrient and enzyme, as shown by Mitchell *et al.* (26). When solely sugar cane bagasse was used as carbon source, there was no growth of *P. viridicatum* (data not shown), indicating that the microorganism was not able to hydrolyse enough cellulose and hemicellulose fibers to support mycelium formation. These supposition was confirmed by the low level of cellulase and xilanase produced by this fungus in the experiments (data not shown). The sugar cane bagasse appeared to be only a solid inert support, being microorganism growth and enzyme production stimulated by wastes addition. The use of sugar cane bagasse as support is suitable for the growth of filamentous fungi and it allowed the utilization of high-concentration substrate solutions (30). This supposition is confirmed in solid-state culture of *Aspergillus niger* (31).

Our results indicated that, in addition to the effect of reducing sugar concentration, Pg and Pl production was influenced by media composition, reaching higher values in media containing high pectin and nutrient concentration

Table 1. Production of pectinase (U.g^{-1}) by *P. vidiricatum* Rfc3 in solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products.

Substrate	Polygalacturonase		Pectin lyase	
	Maximal production (Ug^{-1})	Cultivation (days)	Maximal production (Ug^{-1})	Cultivation (days)
Wheat bran	30.0	4	1200	8
Orange bagasse	12.0	6	2000	4
Mango peel	5.0	4	450	4
Corn tegument	10.0	4	650	2
Banana peel	7.5	6	150	10
Sugar cane bagasse and wheat bran	27.0	8	1500	10
Sugar cane bagasse and orange bagasse	9	8	2500	12
Sugar cane bagasse and mango peel	15.0	8	1500	10
Sugar cane bagasse and corn tegument	5.0	8	500	10
Sugar cane bagasse and banana peel	15.0	6	1000	10
Orange bagasse and wheat bran	55.2	8	3540	12

(orange bagasse and wheat bran). The mixture of orange bagasse and wheat bran showed to be the best medium for pectinase production, with 55.2 U and 3540 U of Pg and Pl per gram of substrate, respectively. The effect of different carbon sources on pectinase synthesis by fungi in submerged and solid-state fermentation have already been studied, and it is generally agreed that the optimum medium for the enhanced production of extracellular pectinase is that containing pectic materials as an inducer (14,16,20,29,40).

The quantities of Pg and Pl obtained in our study were high compared to those reported for pectinolytic strains such as *Aspergillus niger* (25 U Pg and 350 U Pl per gram of substrate), *P. italicum* (6U Pl/g e 25U Pg/g), *P. frequentans* (3.4 U Pg /g) and *A. foedidus* (1000 U Pl/g) cultivated on solid substrates (8,9,18,21). However, the comparison of enzyme levels produced by different organisms is not straightforward, since distinct culture conditions and enzyme activity determinations have been used.

These results showed that SSF was suitable for pectinase production by *P. viridicatum* using agricultural and agro-industrial wastes and by-products.

Assays to evaluate the effect of temperature incubation (28°C and 30°C) and initial pH of the medium (4.5 and 5.0) on Pg and Pl production were carried out. The results indicated that maximal quantity of Pg was not significantly influenced by temperature or pH, but the production profile of this enzyme, during fermentation period, varied as a function of initial substrate pH (Fig. 1a; 1b). At pH 5.0, the peak of Pg production occurred in the 4th day whereas at pH 4.5, in the 8th day. The pH values seem to influence enzyme stability (Fig 1a; 1b). On the other hand, Pl production decreased at 30°C, although the pH effect was similar to that observed for Pg production.

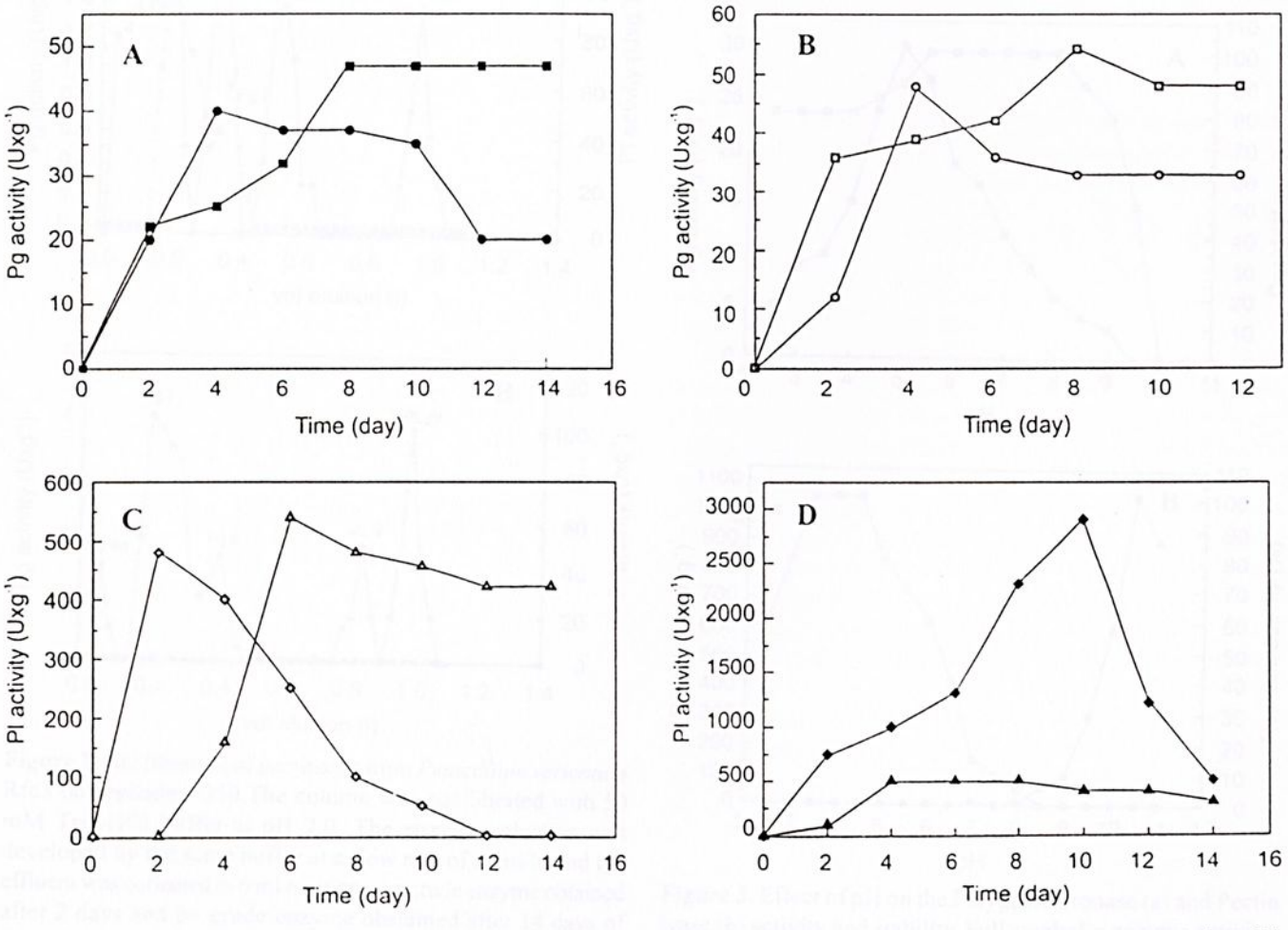


Figure 1. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* in orange bagasse and wheat bran mixture (1:1). Full symbol (A,D): 28°C and open symbol (B,C): 30°C. Polygalacturonase: ■ □ opH 4.5; ● ○ pH 5.0; Pectin lyase ▲ △ pH 4.5; ♦ ◇ pH 5.0.

Enzymes separation by gel filtration

Gel filtration in Sephadex G50 of the crude enzyme solutions obtained after two days of fermentation resulted in two peaks of Pg and four peaks of Pl (Fig. 2a). Enzyme solution, obtained from medium after 14 days of fermentation, presented three peaks of Pg and two peaks of Pl (Fig. 2b). The position of the enzymes in the chromatogram suggests that two Pgs (I and II) and one Pl (IV) are produced during the whole fermentation period, while three Pl (I, II and III) are observed only in the initial stage of fermentation. After 14 days, both Pg (III) and Pl (V) are produced.

The comparison between Pg and Pl production during growth of *P. viridicatum* suggests a sequential induction of these enzymes. Sequential production of pectinases have been reported by various authors for different microorganisms (11,15,21,24,38) indicating that this is characteristic of fungi and bacteria. Other hemicellulolytic enzymes presented similar profiles (22).

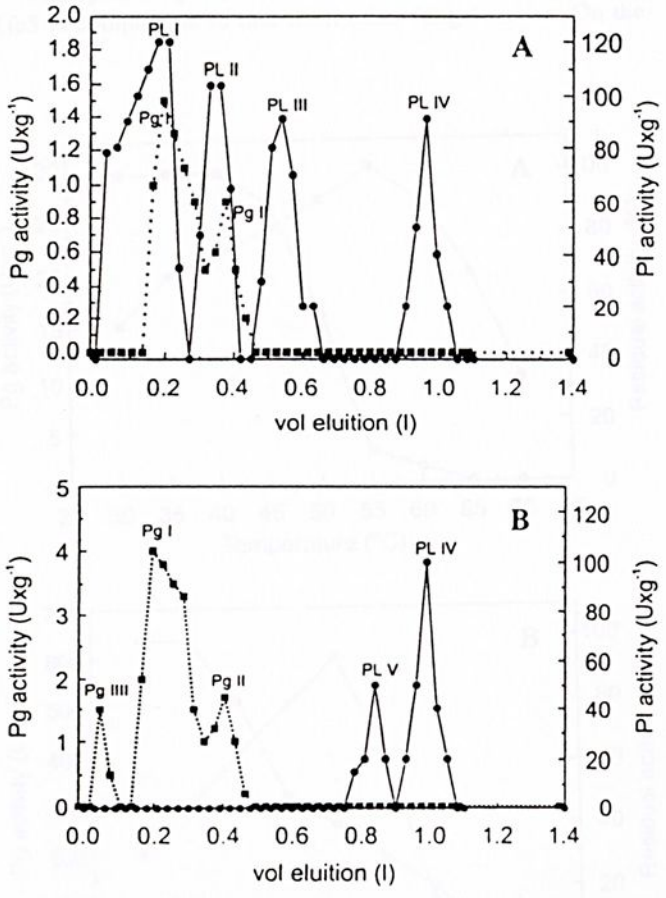


Figure 2. Gel filtration of pectinases from *Penicillium vericatum* Rfc3 on sephadex G50.The column was equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer at pH 7.0. The enzymes eluition was developed by the same buffer at a flow rate of 24ml/h, and the effluent was collected in 6 ml fractions. a= crude enzyme obtained after 2 days and b= crude enzyme obstained after 14 days of fermentation. ■ polygalacturonase; ● pectin lyase.

Enzyme characterization

Characterization of the fractions of polygalacturonase (I) and pectin lyase (IV) obtained by gel filtration in Sephadex G50 was carried out. Pg exhibited maximal activity at pH 5.0 (Fig.3 a) and Pl, at pH 10.5 (Fig. 3b). Pg II was stable at pH 5.0-8.0 and maintained 80% of its activity at pH 9.0 (Fig. 3a). Pl was more sensitive to pH variation, presenting maximum stability at pH 3.5-4.5 which declined to 80% at pH 5.0 and to 60% at pH 6.0 (Fig. 3b).

The optimum temperature for Pg activity was 55°C, presenting 90% of the maximum activity at 60°C and 67% at 65°C (Fig. 4a). As illustrated in Fig. 4b, Pl presented optimal activity at 50°C and 67% of this activity at 55°C. After incubation

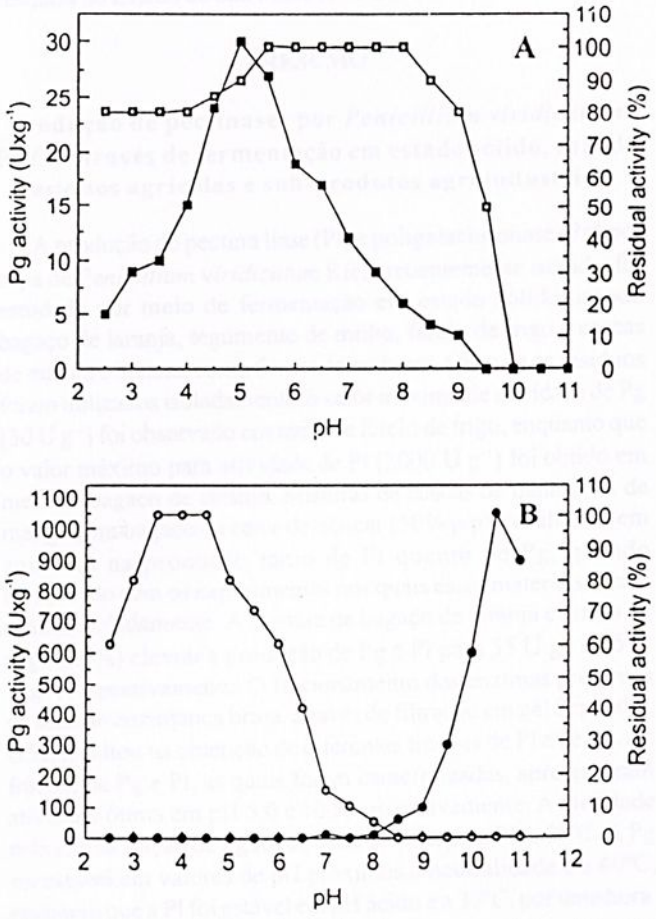


Figure 3. Effect of pH on the Polygalacturonase (a) and Pectin lyase (b) activity and stability. Full symbol = enzyme activity; open symbol= enzyme stability.

at 40°C for 1h, the retained activities of Pg and Pl were 100% and 80% respectively. After 1h at 50°C 55% of original Pg activity was maintained while the same conditions of incubation reduced original Pl activity by 60% (Fig. 4 a,b).

Previous data indicated differences between physico-chemical properties of enzyme in crude solution (data not shown) and Pg and Pl fractions. Pg I fraction presented higher optimum temperature than crude enzyme solution, which maximal activity between 45 to 50°C. The fraction studied was stable in neutral pH while activity of the crude enzyme was highest in acidic pH. Pl IV fraction showed to be more alkalophilic (optimum pH was 10.5) and more thermostable than the crude enzyme, which presented optimum pH of 8.5 and maintained only 30% of the original activity at 40°C. These data indicate that pectinases with different properties were produced.

The optimum pH (5.0) found for Pg I from *P. viridicatum* Rfc3 is comparable to that from other fungal strains. On the other hand, optimum pH for Pl IV (10.5-11.0) is above the one found for fungal Pl (42), being similar to pectinases from bacteria (*Bacillus* sp) described by Kobayashi *et al.* (23).

In terms of thermal stability and optimum temperature for activity, pectinases from *P. viridicatum* Rfc3 were similar to those reported for several fungal species (36,37). Pectinases from *Aspergillus* strains have been described as susceptible to denaturation in temperature above 50°C (5,17,41).

The present work shows that is feasible to use agro-industrial wastes and agro-industrial by-product for production of polygalacturonase and pectin lyase by *Penicillium viridicatum* strain Rfc3. This newly isolated fungus is able to produce extracellular polygalacturonase and pectin lyase during solid state fermentation, in which different pectinases are produced.

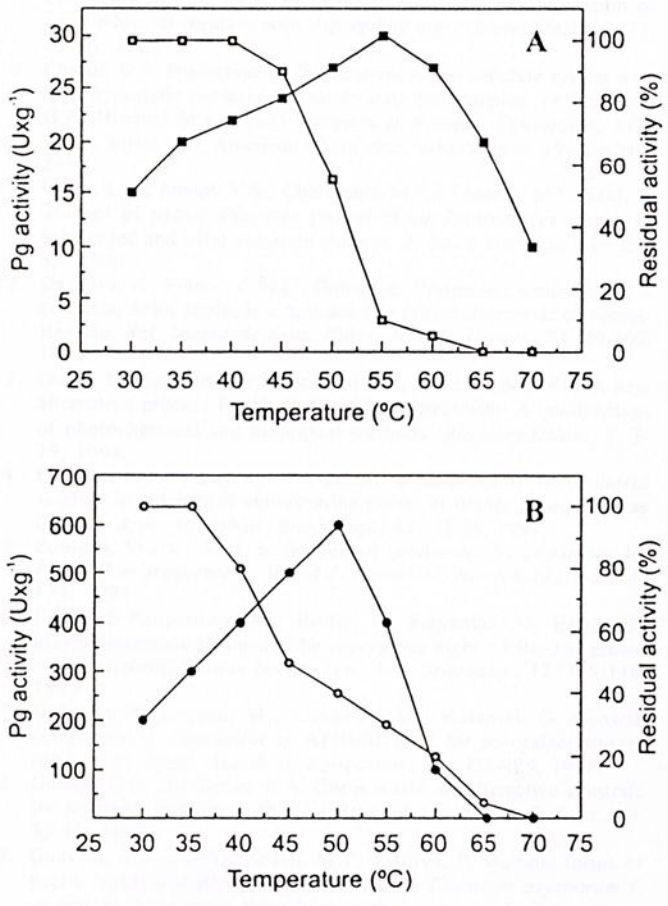


Figure 4. Effect of temperature on the Polygalacturonase (a) and Pectin lyase (b) activity and stability. Full symbol = enzyme activity; open symbol= enzyme stability.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

RESUMO

Produção de pectinases por *Penicillium viridicatum* RFC3 através de fermentação em estado sólido, usando resíduos agrícolas e sub-produtos agroindustriais

A produção de pectina liase (Pl) e poligalacturonase (Pg) por cepa de *Penicillium viridicatum* Rfc3, recentemente isolada, foi estudada por meio de fermentação em estado sólido usando bagaço de laranja, tegumento de milho, farelo de trigo e cascas de manga e banana como fontes de carbono. Quando os resíduos foram utilizados isoladamente, o valor máximo de atividade de Pg (30 U g^{-1}) foi observado em meio de farelo de trigo, enquanto que o valor máximo para atividade de Pl (2000 U g^{-1}) foi obtido em meio de bagaço de laranja. Misturas de cascas de banana ou de manga com bagaço de cana-de-açúcar (50% p/p), resultaram em aumento na produção tanto de Pl quanto de Pg, quando comparado com os experimentos nos quais esses materiais foram usados isoladamente. A mistura de bagaço de laranja e farelo de trigo (50%) elevou a produção de Pg e Pl para 55 U.g^{-1} e 3540 U.g^{-1}, respectivamente. O fracionamento das enzimas presentes na solução enzimática bruta, através de filtração em gel Sephadex G50, resultou na obtenção de diferentes frações de Pl e de Pg. As frações de Pg e Pl, as quais foram caracterizadas, apresentaram atividade ótima em pH 5,0 e 10.5, respectivamente. A atividade máxima da fração de Pg foi obtida a 55°C e, para Pl, a 50°C. A Pg foi estável em valores de pH próximos à neutralidade e a 40°C, enquanto que a Pl foi estável em pH ácido e a 35°C, por uma hora.

Palavras-chave: *Penicillium viridicatum*, poligalacturonase, pectina liase, "wastes, by-product".

REFERENCES

1. Aguillar, G.; Huitron, C. Stimulation of production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp by galacturonic acid and glucose additions. *Enz. Microbiol. Technol.*, 9: 690-696, 1987.
2. Albersheim, P. Pectin lyase from fungi. *Methods Enzymol.*, 8: 628-631, 1966.
3. Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama J.M.; Serra, J.L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochem.*, 33: 21-28, 1998.
4. Bacarat, M.C.; Valentin, C.; Muchovej, J.J.; Silva, D.O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. *Biotechnol. Lett.*, 11: 899-902, 1989.
5. Bailey, M.J.; Pessa, E. Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microb. Technol.*, 12: 266-271, 1990.
6. Barreto de Menezes, T.J.; Salva, J.G.; Baldini, V.L.; Papini, R.S.; Sales, A.M. Protein enrichment of citrus wastes by solid substrate fermentation. *Proc. Biochem.*, 23: 167-171, 1989.
7. Buswell, J.A.; Cai, Y.J.; Chang, S.T.; Peterdy, J.F.; Fu, S.Y.; Yu, H.S. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. *World J. Microb. Biotech.*, 12: 537-542 1996.
8. Castilho, L.R.; Alves, T.L.M.; Medronho, R.A. Recovery of pectinolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. *Process Biochem.*, 34: 181-186, 1999.
9. Castilho, L.R.; Alves, T.L.M.; Medronho, R.A. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. *Biores. Technol.*, 71: 45-50, 2000.
10. Chahal, D.S. Production of *Trichoderma reesei* cellulase system with high hydrolytic potential by solid –state fermentation. *In*: Leathem, G.F.; Himmel M.E.; (Eds): *Enzymes in Biomass Conversion*, ACS Symp. Series 460, American Chem. Soc, Whashington, 1991, p.247-269.
11. Crotti, L.B.; Jabopr, V.A.; Chellegatti, M.A.; Fonseca, M.J.; Said, S. Studies of pectic enzymes produced by *Talaromyces flavus* in submerged and solid substrate cultures. *J. Basic Microbiol.*, 39: 27-35, 1999.
12. Da Silva, R.; Franco, C.M.L.; Gomes, E. Pectinases, hemicelulases e celulases: ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. *Bol. Sociedade Bras. Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 31: 49-260, 1997.
13. Duran, N.; Esposito, E.; Innocentini-Mei, L.H.; Canhos, V.P.; A new alternative process for Kraft El effluent treatment. A combination of photochemical and biological methods. *Biodegradation.*, 5: 3-19, 1994.
14. Fonseca, M.J.V.; Said, S.; The pectinase produced by *Tubercularia vulgaris* in submerged culture using pectin or orange-pulp pellets as inducer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 42: 32-35, 1994.
15. Fonseca, M.J.V.; Said, S. Sequential production of pectinases by *Penicillium frequentans*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11: 174-177, 1995.
16. Galiotou-Panayotou, M.; Rodis, P.; Kapantai, M. Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin. *Lett. Apll. Microbiol.*, 17: 145-148, 1993.
17. Galiotou-Panayotou, M.; Kapantai, M.; Kalantzi, O. Growth conditions of *Aspergillus sp* ATHUM-3482 for polygalacturonase production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47: 425-429, 1997.
18. Garzón, C.G. and Hours, R.A. Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. *Biores. Technol.*, 39: 93-95, 1992.
19. Guevara, M.A.; Gonzalez-Jen, M.T.; Estevez, P. Multiple forms of pectic lyases and polygalacturonases from *Fusarium oxysporum* f. sp redicais lycopersici: Regulation of their synthesis by galacturonic acid. *Canadian J. Microbiol.*, 43: 245-253, 1997.
20. Hang, Y.D.; Woodanms, E.E. Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. *Lebensm. Wiss. U. Techno.*, 27: 194-196, 1994.
21. Hours, R.A.; Voget, C.E.; Ertola, R.J. Some factories affecting pectinase production from apple pomace in solid states cultures. *Biological wastes.*, 24: 147-157, 1988.
22. Ismail, A.S. Utilization of orange peels for the production of multi-enzyme complexes by some fungal strains. *Process Biochem.*, 1: 645-650, 1996.
23. Kobayashi, T.; Hatada, Y.; Higaki, N.; Lusterio, D.D.; Ozawa, T.; Koike, K.; Kawai, S.; Ito, S. Enzymatic properties and deduced amino acid sequence of a high-alkaline pectate lyase from na alkaliphilic *Bacillus* isolate. *Bioch. Biophys. Acta.*, 1427: 145-154, 1999.
24. Leone, G.; Heuvel, J.; Van Den Heuvel, J. Regulation by carbohydrates of the sequential *in vitro* production of pectic enzymes by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Bot.*, 65: 2133-2141, 1987.
25. Miller, G.L. Use of dinitrossalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem.*, 31: 426-428, 1959.
26. Mitchell, D.A.; Do, D.D.; Greenfield, P.F.; Doelle, H.W. A semi-mechanistic mathematical model for growth of *Rhizopus oligosporus* in a model solid-state fermentation system. *Biotechnol. Bioeng.*, 38: 353 62, 1991.
27. Mitchell, D.A.; Krieger, N.; Stuart, D.M.; Pandey, A. New developments in solid-state fermentation. II. Rotational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. *Process. Biochem.*, 35: 1211-1225, 2000.
28. Mutlu, M.; Srioglu, K.; Demir, N.; Ercan, M.T.; Acar, J. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. *J. Food Engen.*, 41: 147-150, 1999.
29. Naidu, G.G.N.; Panda, T. Production of pectolytic enzymes- a review. *Bioprocess Eng.*, 19: 355-361, 1998.
30. Ooijkaas, L.; Weber, F.J.; Buitelaar, R.M.; Tramper, J.; Rinzema, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends Biotechnol.*, 18: 356-360, 2000.
31. Oriol, E.; Schettino, B.; Viniegra-Gonzales, G.; Raimbaut, M. Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. *J. Ferment. Technol.*, 66: 57-62, 1988.
32. Oudot, J.; Dupont, J.; Haloui, S.; Roquebert, M.F. Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi. *Soil Biol. Biochem.*, 25: 1167-1173, 1993.
33. Pandey, A.; Soccol, C.R.; Nigam, P.; Soccol, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugar cane bagasse. *Bioresource Technol.*, 74: 69-80, 2000.
34. Pilnik, W.; Voragen, A.G.J. Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufature. *In:* Nagodawithama, T.; Reed, G. (eds). *Enzymes in Food Processing*, Academic Press, New York 1993, p.363-399.
35. Reid, I.; Ricard, M. Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide *Enz. Microbiol. Technol.*, 26: 115-123, 2000.
36. Riou, C.; Freyssinet, G.; Feure, M. Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Appl. Env. Microbiol.*, 58: 578-583, 1992.
37. Ryazanova, L.P.; Mikhaleva, N.I.; Solov'eva, I.V.; Boev, A.V.; Okunev, O.N.; Kulaev, I.S. Pectolytic enzymes from *Aspergillus heteromorphus*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 32: 1-6, 1996.
38. Soares, M.M.C.N.; Da Silva, R.; Gomes, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity characterization of the Pgase produced by *Bacillus species*. *Rev. Microbiol.*, 30: 229-303, 1999.
39. Soares, M.M.C.N.; Da Silva, R.; Carmona, E.C.; Gomes, E. Pectinolytic enzymes production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 79-82, 2001.
40. Solis-Pereira, S.; Favela-Torres, E.; Viniegra-Gonzales,G.; Gutierrez-Rofas, M. Effects of different carbon source on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Appl. Microbiol. Biothnol.*, 39: 36-41, 1993.
41. Ueda, S.; Yusaku, F.; Lim, J.Y. Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A-3. *J. Appl. Biochem.*, 4: 524-532, 1982.
42. Whitaker, J.R. *Microbial Enzymes and Biotechnology*, *In:* Fogarty, W.M.; Kelly, C.T. (eds). Elsevier, London, 1990, p.133-176.

[**Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada**, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Cristóvão Colombo, 2265, São José do Rio Preto, São Paulo, CEP 15054-000].

PRODUCTION OF PECTINASE BY SOLID STATE FERMENTATION WITH *Penicillium viridicatum RFC3*

DÊNIS SILVA, KIVIA TOKUIOSHI, Eduardo da Silva Martins, ROBERTO DA SILVA and ELENI GOMES*

Endo-polygalacturonase (endo-PG), exo- polygalacturonase (exo-PG) and pectin liase(PL) were produced by solid-state fermentation of a mixture of orange bagasse and wheat bran (1:1) with the filamentous fungus Penicillium viridicatum RFC3. This substrate was prepared with two moisture contents, 70 and 80%, and each was fermented in two types of container, Erlenmeyer flask and polypropylene pack. When Erlenmeyer flasks were used, the medium containing 80% of initial moisture afforded higher PL production while neither exo nor endo-PG production was influenced by substrate moisture. The highest enzyme activities obtained were 0.70 U.mL^{-1} for endo-PG, 8.90U mL^{-1} for exo-PG, and 41.30 U mL^{-1}for PL. However, when the fermentation was done in polypropylene packs, higher production of all three enzymes was obtained at 70% moisture (0.7 and 8.33 U mL^{-1} for endo and exo-PG and 100 U mL^{-1} for PL). An increase in the pH and decrease in the reducing sugar content of the medium was observed. The fungus was able to produce pectin esterase and other depolymerizing enzymes such as xylanase, CMCase, protease and amylase.

Introduction

The growing conditions in solid-state fermentation (SSF) approximate the natural habitat of filamentous fungi more closely than those in liquid culture, so these microorganisms are able to grow well on solid substrate and excrete large quantities of enzyme [5]. Waste material from agro-industrial processes may be used as the substrate for microbial growth. The organic matter in this material is used both as a source of energy for growth and as carbon for synthesis of cell biomass and other products of microbial metabolism, so that the waste is upgraded and valuable products may be synthesized [10].

One of the largest cellulosic agro-industrial by-products abundantly produced in Brazil is orange bagasse, from the citrus juice industries. Orange bagasse, composed of peel,

seed and pulp, is dried and marketed as a component of animal feed, but since the selling price of the products is low and the evaporation of water from this waste consumes large amounts of heat, the production of dried citrus feed is valuable only as a waste disposal method, with marginal economic benefits [10]. Several processes and products have been reported that utilize orange bagasse as a raw material. These include products of fermentation, such as protein, ethanol and enzymes [6, 11, 16].

Pectinases are a group of enzymes that hydrolyze the pectin present in vegetable cells by various mechanisms and are divided into those that lyse glycosidic bonds along the polymer backbone - polygalacturonase, pectin lyase and pectate lyase - and those that split methoxy groups -pectin esterase [4]. According to several authors [1, 2, 11, 16] the production of these enzymes on solid substrate, such as agricultural residues, is affected by culture conditions such as moisture, pH and type of bioreactor.

In light of the above points, the aim of the current study was to investigate the production of polygalacturonases (endo and exo) and pectin lyase by *Penicillium viridicatum* RFC3, by means of solid state fermentation of a mixture of orange bagasse and wheat bran (1:1) in Erlenmeyer flasks and polypropylene packs, at two different substrate moisture contents.

Materials and methods

Microorganism and inoculum: The microorganism used was *Penicillium viridicatum* RFC3 isolated from decaying vegetable in São José do Rio Preto, SP, Brazil and maintained as stock culture on Sabouraud dextrose agar (Oxoid) containing 0.3% citrus pectin. Conidia were suspended in 0.1% Tween 80 and a volume equivalent to 10^7 spores per gram of substrate was used as inoculum.

Medium for solid substrate fermentation (SSF) and enzyme production:

The composition and processing of the solid substrate has been described previously [11]. Briefly, 10g and 30g aliquots, respectively, of a 1:1 (w/w) mixture of wheat bran and orange bagasse were placed in 250 mL Erlenmeyer flasks and 20x30 cm polypropylene packs, sterilized at 120°C for 40 min and hydrated with 0.1% $(NH_4)_2SO_4$ and 0.1% $MgSO_4.7H_2O$ sterile solution, to 70% or 80% moisture. This substrate was inoculated and cultured at 28°C for 14 days, to produce the enzymes by solid-state fermentation (SSF). Every two days, one flask and one pack was removed and the fermented material in each was mixed with 8 mL

distilled water per gram of substrate, stirred for 30 min, filtered and centrifuged. The supernatant was used as crude enzyme solution.

Measurement of reducing and total sugar: The total sugar content was measured by adding 2N HCl to an aliquot of sample (1:1 v/v) and boiling for10 minutes to hydrolyze the sugar. The hydrolyzate was neutralized with NaOH 2N. The reducing sugar content was determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method [12].

Enzyme activity measurements

Exo-polygalacturonase (exo-PG), amylase, xylanase, CMCase: Enzyme activities were assayed by mixing 0.2 ml of sample of culture medium and 0.8 mL of the specific substrate solution. Xylanase activity was determined with 1.0 % birchwood xylan (Sigma) as substrate, in 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.0) at 50°C for 10 min. CMCase and amylase activities were determined by the same procedure described for xylanase, but using carboxymethylcellulose (Merck) and soluble starch (Merck) as substrate, respectively. Polygalacturonase activity was determined with a 1% solution of pectin (Sigma) in 0.2M sodium acetate buffer (pH 5.5) at 50°C for 10 min. The number of reducing groups, expressed as xylose, glucose or galacturonic acid released by enzymatic action, was quantified by the DNS method [12]. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme releasing one μmol of galacturonic acid, glucose, xylan or glucose respectively per minute.

Endo-polygalacturonase (endo-PG) was measured viscosimetrically by adding 2mL of crude enzyme to 6mL of citrate-NaOH buffer (pH 5.5) containing 3% of 67% methoxylated citric pectin (Braspectina). The reaction mixture was incubated at 50°C for 15 minutes, after which its viscosity was determined with a Basic viscosimeter (Fungilab).The blank contained thermally-inactivated crude enzyme. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme that reduced the initial viscosity by 50% per minute.

Pectin lyase (PL) was assayed by measuring the increase in absorbance at 235 nm of substrate solution (0.8 ml 1% citric pectin in 0.2M Tris/HCl buffer, pH 8.5) hydrolyzed by 0.2 ml enzyme solution, at 50°C. One unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount releasing 1 μmol of unsaturated uronide per minute, based on the molar extinction coefficient (5500) of the unsaturated products [3].

Pectin Methylesterase (PE) was assayed by measuring the methanol liberated from pectin solution, colorimetrically. The reaction mixture, containing 0.8 ml of a 1% solution of 67% methoxylated citric pectin (Braspectina) in 0.2M acetate buffer (pH 5.0) and 0.2 ml of crude

enzyme solution, was incubated at 50°C for 10 min. One unit of the PE was defined as the activity that released one µmol of methanol released per minute under defined conditions.

The enzyme production was expressed in units per milliliter of crude enzyme solution (U/mL) and in units per gram of substrate (U/g).

Statistical analysis: Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using the factorial design 2x2x7 (fermentation vessel x moisture x. growth period) for the three different enzymes (exo-PG, endo-PG and PL) and the Tukey multiple range test, using the Estat software (Free).

Results and Discussion

The results from the fermentation in Erlenmeyer flasks are shown in Figure 1. Endo-PG production peaked between 96 and 144 hours of growth, with a maximum activity of 0.7 U mL^{-1} (or 5.6 Ug^{-1} of substrate), for both 70% and 80% initial moisture (Fig. 1a). Exo-PG activity was observed after 48h of fermentation, with peak values at 336h for initial moisture of both 70% (5.8 U mL^{-1} or 46.4 Ug^{-1}) and 80% (8.9 U mL^{-1} or 71.2Ug^{-1}) (Fig. 1b).

The medium containing 80% initial moisture afforded higher PL production (60.0 U mL^{-1} or 480 Ug^{-1}) in the first hours of fermentation than that with 70% (39.3 U mL^{-1} or 314.4 Ug^{-1}). However, after 240h of fermentation, the higher PL activity was obtained when the initial moisture content was 70% (79.7 U mL^{-1} or 637.6 Ug^{-1}) (Fig.1C).

Figure 2 shows the data from fermentation in a polypropylene pack. Endo-PG production on substrates with 80% and 70 % of initial moisture peaked at 48 h and 96h of growth respectively, but the maximum activities were very similar (0.88 U mL^{-1} or 7.0 Ug^{-1} of substrate at 70% and 0.93 U mL^{-1} or 7.4Ug^{-1} at 80%) (Fig. 2a). Exo-PG activity was highest at 336h in medium with initial moisture of 70% (8.3 U mL^{-1} or 66.4 Ug^{-1}).

As with the Erlenmeyer flask cultures, PL production in polypropylene packs containing substrate with 70% initial moisture exceeded that with 80% moisture in the later part of the batch culture, peaking at 288 h (100.0 U mL^{-1} or 800.00 Ug^{-1}) (Fig. 2C).

On the basis of these results, variation of moisture content between 70 and 80% does not affect substantially endo and exo-PG production by *P. viridicatum* Rfc3 (the difference was not statistically significant), whereas the lower moisture content (70%) was favorable to PL production (1% level of significance).

According to [7, 8], substrate humidity between 80% and 90% was ideal for production of pectinases by *Aspergillus foetidus* on apple pulp. Highest pectinase activity was

obtained by [18] in a fermentation on corn and wheat bran with 70% moisture. On the other hand, in the case of *A. niger*, Raimbult and Alzard (1980) obtained best growth on media with moisture contents ranging from 50% to 55% and [5] showed that an initial moisture content of 40% provided better conditions for production of pectinases than those of 25%, 55% and 70%.

The control of moisture content is an important parameter in solid fermentation. A high moisture content has negative consequences for growth, as the porosity of the medium and oxygen diffusion are reduced. However, in medium with low water-availability fungi suffer modifications in their cell membrane, leading to transport limitations and affecting microbial metabolism [1, 14].

Comparing pectinase production in Erlenmeyer flask and polypropylene pack, it was found that the latter afforded a higher enzyme level, suggesting it to be an appropriate recipient for scaled-up tests.

It was observed that the reducing sugar present in the media fell to 20% of the initial value after 48h fermentation in most of the assays (Fig 1d and 2d). These results corroborate data from solid-state fermentation described by [1, 11, 16].

The pH of the medium rose significantly in both Erlenmeyer flask and polypropylene pack(?) at 80% and 70% moisture, the biggest rise being from 4.5 to 6.7 at 70% (Fig. 1d and 2d). These data contrast with those presented by [2, 8], who reported a decrease in the pH of the medium during the fermentation of apple pomace and citrus pectin.

Alkalinization of the medium in fermentative processes has generally been associated with ammonia release, resulting from protein metabolism breakdown, and the main mechanism is likely to be oxidation of amino acids during their utilization as energy sources [13; 17]. Other possible alkali-generating metabolic reactions include the uptake and oxidation of the anions of organic acids. Considering that proteolytic activity in the media was low (Fig. 3), and that protein and amino acids were not major carbon and energy sources in these fermentations, it is possible likely that uptake of acid is involved in this alkalinization.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

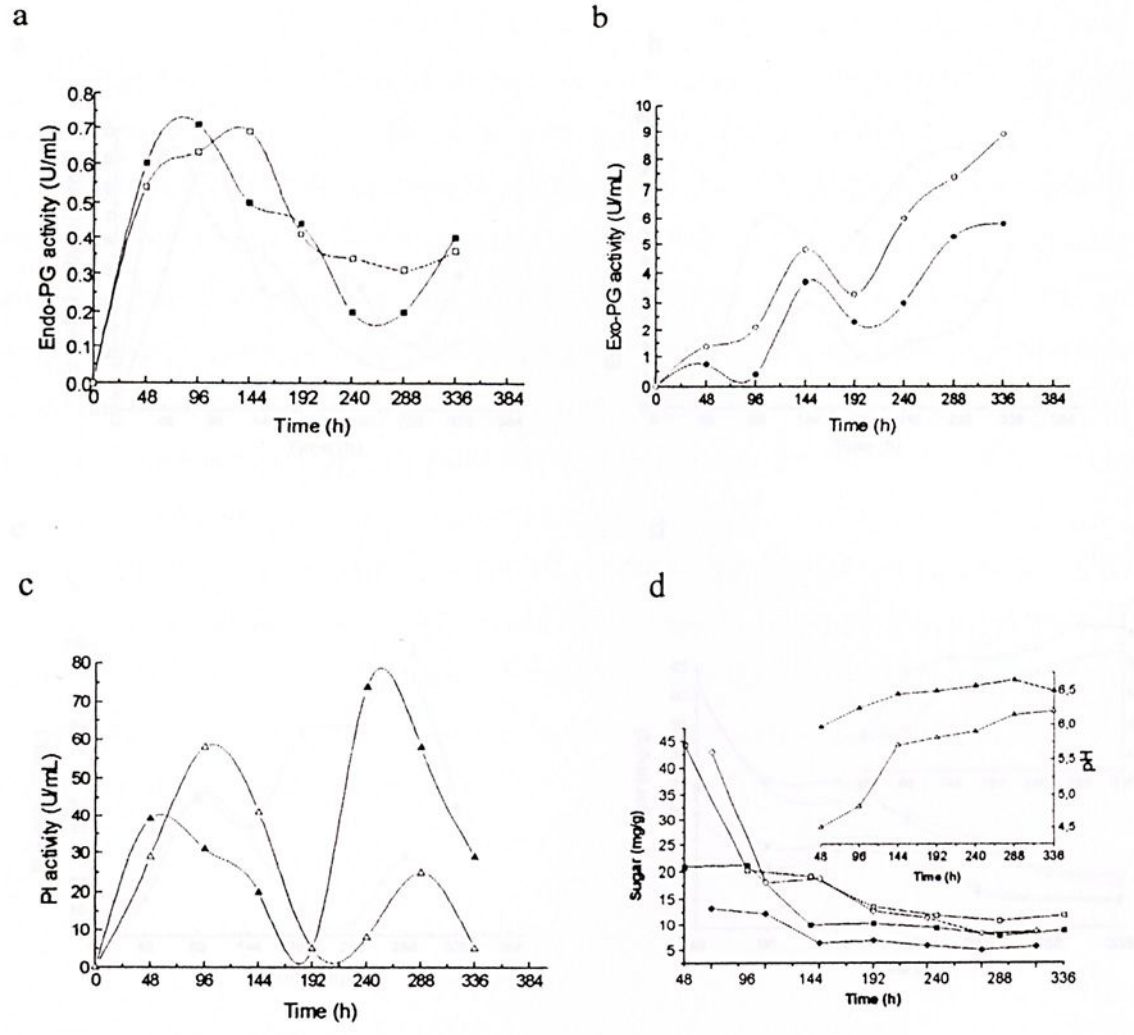


Figure 1: Production of pectinases in SSF using wheat bran and orange bagasse mixture (1:1) in Erlenmeyer flasks. a= Endo-PG; b= Exo-PG; c=PL; d= pH value and total (♦, ◊) and reducing sugar (■, □).
Full symbol = 70% substrate moisture; Open symbol = 80% substrate moisture.
Variation of enzyme activity in the medium with time of growth was significantly different between Exo-PG, Endo-PG and PL (1% level). PL production on media with 70% and 80% moisture differed significantly (1% level).

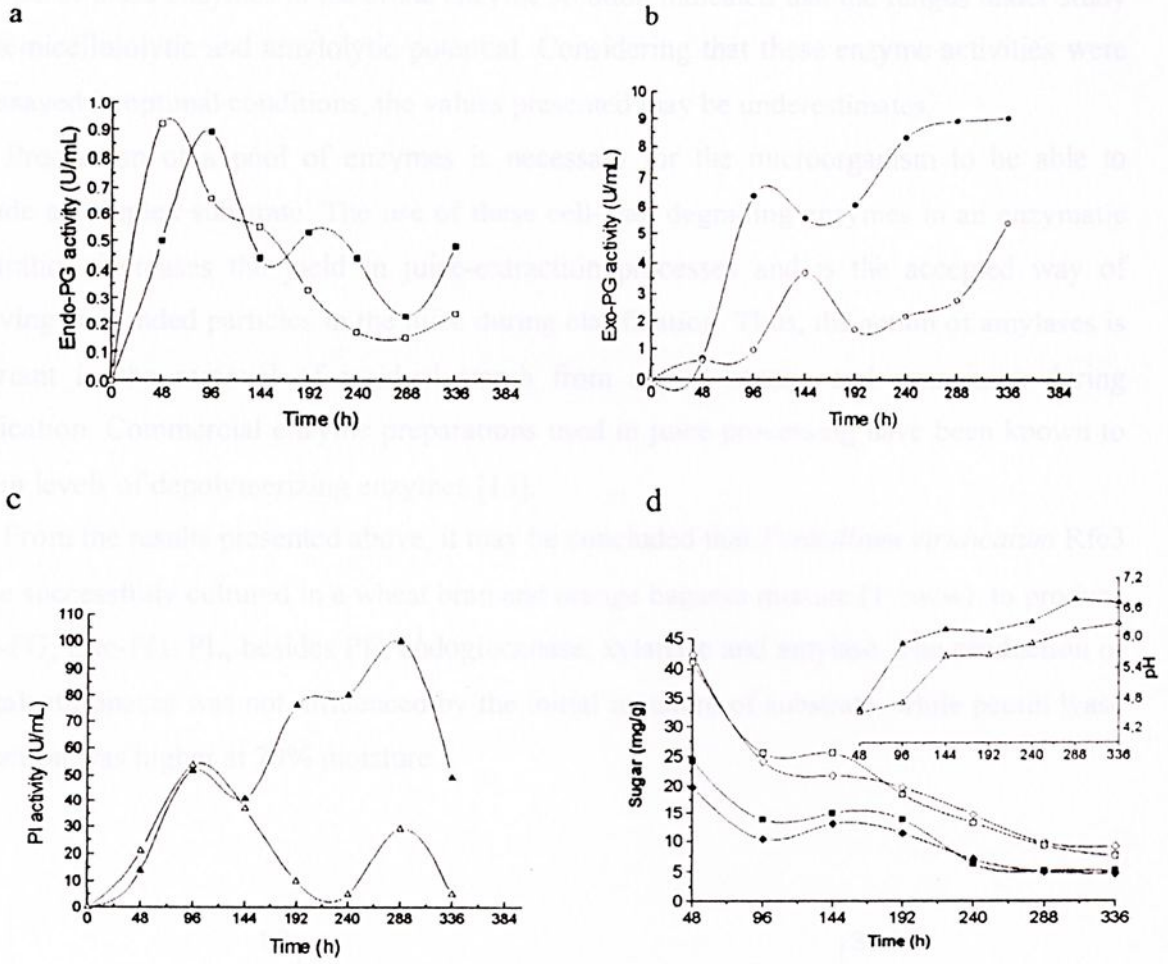


Figure 2: Production of pectinases in SSF using wheat bran and orange bagasse mixture (1:1w/w) in polypropylene pack a = endo-PG; b= exo-PG; c=PL; d= pH value and total (♦, ◇) and reducing sugar (■, □).
Full symbol = Moisture of substrate 70% Open symbol= Moisture of substrate 80%
Variation of enzyme activity in the medium with time of growth was significantly different between Exo-PG, Endo-PG and PL (1% level). PL production on media with 70% and 80% moisture differed significantly (1% level).

Besides polygalacturonases and pectin liase, pectinesterase (PE) was detected in fermentation medium with a maximum activity of 26 U/mL, after 288 h of fermentation (Fig. 3). The presence of this enzyme can facilitate some processes in which treatment with pectinases is required. Mixtures of PG, PL and PE have been used to extract or clarify apple and pear juice, and to treat solid waste from a citrus-fruit extractor (peel, seeds and pulp) that can be used to make animal feed [9].

Other hydrolytic enzymes were produced during the fermentation, such as endoglucanase (CMCase), xylanase, and amylase (Fig 3). Although their activity was low, the

presence of these enzymes in the crude enzyme solution indicated that the fungus under study has hemicellulolytic and amylolytic potential. Considering that these enzyme activities were not assayed in optimal conditions, the values presented may be underestimates.

Production of a pool of enzymes is necessary for the microorganism to be able to degrade a complex substrate. The use of these cell-wall degrading enzymes in an enzymatic preparation increases the yield in juice-extraction processes and is the accepted way of removing suspended particles in the juice during clarification. Thus, the action of amylases is important in the removal of residual starch from apple, banana and pear juice during clarification. Commercial enzyme preparations used in juice processing have been known to contain levels of depolymerizing enzymes [15].

From the results presented above, it may be concluded that *Penicillium viridicatum* Rfc3 can be successfully cultured in a wheat bran and orange bagasse mixture (1:1w/w), to produce Endo-PG, Exo-PG, PL, besides PE, endoglucanase, xylanase and amylase. The production of polygalacturonases was not influenced by the initial moisture of substrate, while pectin lyase production was higher at 70% moisture.

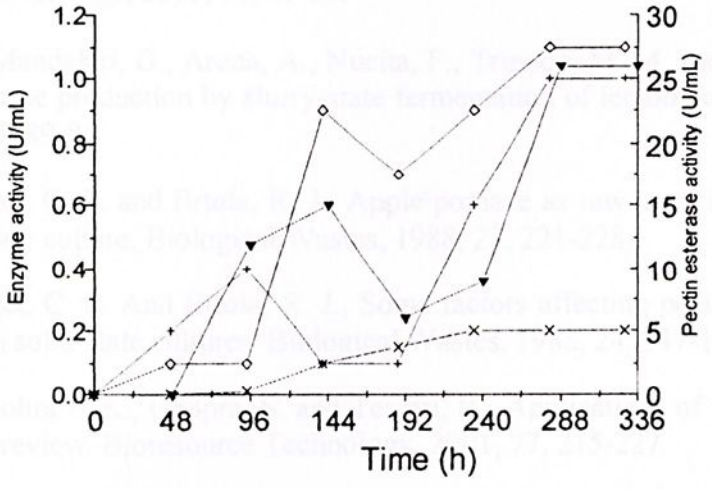


Figure 3: Hydrolytic enzymes produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid-state fermentation of mixture of wheat bran and orange bagasse (1:1 w/w).CMCase (-X-), xylanase (-◇-), pectin esterases (-▼-) and amylase (-+-).

Acknowledgements

We thank FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - for financial support.

References

1. Acuña-Argüelles, M. E., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G. and Favela-Torres, E., Production and properties of three pectinolytic activities produced by Aspergillus niger in submerged and solid-state fermentation. Applied Microbiology Biotechnology, 1995, 43, 808-814.

2. Aguilar, G., Trejo, B. A., Garcia, J. M. and Huitrón, C., Influence of pH on endo- and exo-pectinase production by Aspergillus sp. CH-Y-1043. Canadian Journal Microbiology, 1991, 37, 912-917.

3. Albersheim, P., Pectin lyase from fungi. Methods Enzymol., 1966, 8, 628-631.

4. Castilho, L. R., Alves, T. L. M. and Medronho, R. A., Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. Process Biochemistry., 1999, 34. 181-186.

5. Castilho, L. R., Medronho, R. A. and Alves, T. L. M., Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, 2000, 71, 45-50.

6. De Gregório, A., Mandalari, G., Arena, A., Nucita, F., Tripodo, M. M. and Locurto, R. B., SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. Bioresource Technology, 2002, 83, 89-84.

7. Hours, R. A., Voget, C. E. and Ertola, R. J., Apple pomace as raw material for pectinases production in solid state culture. Biological Wastes, 1988, 23, 221-228.

8. Hours, R. A., Voget, C. E. And Ertola, R. J., Some factors affecting pectinase production from apple pomace in solid-state cultures. Biological Wastes, 1988, 24, 147-157.

9. Kashyap, D. R., Vohra P. K., Chopra, S. and Tewari, R., Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource Technology, 2001, 77, 215-227.

10. Mahmood, A. U., Greenman, J. and Scragg, A. H., Orange and potato peel extracts: analysis and use as Bacillus substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22, 130-137.

11. Martins, E. S., Silva, D., Da Silva, R. and Gomes, E., Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic Thermoascus aurantiacus. Process Biochemistry, 2002, 37, 949-954.

12. Miller, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry, 1959, 31, 426-428.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

13. Nout, M. J. R. and Rombouts, F. M., Recent developments in tempe research. Journal Applied Bacteriology, 1990, 69, 609-633.

14. Raimbault, M. and Alazard, D., Culture method to study fungal growth in solid state fermentation. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 1980, 9, 199-209.

15. Rombouts, F. M. and Pilnik, W., Enzymes in fruit and vegetable juice technology. Process Biochemistry, 1978, 18, 9-13.

16. Silva, D., Martins, E. S., Da Silva, R. and Gomes, E., Pectinase production from *Penicillium viridicatum* Rfc3 by solid state fermentation using agricultural residues and agro-industrial by-product. Brazilian Journal of Microbiology, 2002, 33, 318-324.

17. Sparringa R. A. and Owens J. D., Causes of alkalinization in tempe solid substrate fermentation. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 25, 677-681.

18. Xia, L. and Cen, P., Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from xylose industry. Process Biochemistry, 1999, 34, 909-912.

***Mailing address:** Eleni Gomes, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Rua Cristóvão Colombo, 2265, Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, São José do Rio Preto – SP, Brasil.

CEP 15054000, Fone: +55-017-2212393, Fax: +55-017-2212390.
e-mail: eleni@bio.ibilce.unesp.br

Pectinase Production by Fungi Strains in Solid State Fermentation Using Agro-Industrial Byproduct

Natalia Martin, Simone Regina de Souza, Roberto da Silva and Eleni Gomes*

Laboratório de Bioquímica e Microbiologia/IBILCE/UNESP,Rua: Cristóvão Colombo, 2265, Jd Nazareth, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto/SP, Brazil, elenig@bio.ibilce.unesp.br

ABSTRACT

Pectin lyase and polygalacturonase production by newly isolated fungi strains was carried out by means of solid state fermentation. The fungi Moniliella SB9 and Penicillium sp EGC5 produced activity of PG and PL on mixture of orange bagasse, sugar cane bagasse and wheat bran as substrate. Pg and Pl produced by Moniliella presented optimum activity at pH 4.5 and 10.0 and at 55 and 45°C, respectively, while these enzymes from Penicillium sp presented optimum activity at pH 4.5-5.0 and 9.0 and 40°C respectively.

Key words: *Penicillium, Moniliella*, polygalacturonase, pectin lyase

INTRODUCTION

Solid-state fermentation is traditionally defined as those processes in which microbial growth and products formation occur on the surfaces of solid substrates in the near absence of free water. Due to this low amount of water available in solid-state bioprocessing, the class of microorganisms that are most commonly used is fungi (Zheng & Shetty, 2000 ; Pandey *et al.*, 2001). Several agro-industrial waste and by-products such as orange bagasse (Martins *et al*, 2002), sugar cane bagasse (Silva *et al.*, 2002) wheat bran (Cavalitto *et al.*, 1996) and other food processing waste (Zheng & Shetty,2000) are effective substrates for depolymerizing enzyme production by solid-state fermentation.

Recently a large number of microorganisms, isolated from different materials, have been screened for their ability to degrade polysaccharide present in vegetable biomass producing pectinases on solid-state culture (Soares *et al.*, 1999; Soares *et al*, 2001; Gomes *et al.*, 2001).

Pectinolytic enzymes are classified according to their way of attack on the galacturonan part of the pectin molecule. They can be distinguished between pectin methylesterases (EC 3.1.11.1), that deesterify pectins to low methoxyl pectins or pectic acid, and pectin depolymerases, which split the glycosidic linkages between galacturonosyl (methyl ester) residues. Polygalacturonases split glycosidic linkage next to free carboxyl groups by hydrolysis while pectate lyase split glycosidic linkages next to free carboxyl groups by β-elimination. Both endo types of PGs and PALs (EC 3.2.1.15 and EC 4.2.2.2, respectively) are known by spliting randomly the pectin chain. Exo-PGs (EC 3.2.1.67) release monomers or dimmers from the non-reducing end of the chain, whereas exo-PALs (EC 4.2.2.9) release unsaturated dimmers from the reducing end. Highly methylated pectins are degraded by endo-pectin lyases (PL; EC 4.2.2.10) and also by a combination of PE with PG or PAL (Sarkanen *et al*, 1991, Pilnik & Voragen, 1993).

In this study, was presented a description of pectolytic enzymes production by newly isolated strains of fungi by solid-state fermentation using agro-industrial by-products. Some physico-chemical characteristics of the enzymes produced were presented.

* Correspondence to Eleni Gomes

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms: The fungi strains used in this study were recently isolated from decaying vegetable and soil, and they were maintained on PDA slopes as a stock culture.

Media, cultivation of microorganism and enzyme production: The solid substrates were prepared as follows:

a) Orange bagasse. The pellet of orange bagasse (pressed mixture of pulp and peel) was provided by Citrovita Agro-industrial Ltda/ Catanduva/SP/ Brazil. Chemical analysis revealed that the dry material was composed of 11.8% fiber, 6.4% protein, 63% nitrogen, 6.7% ash, 19% total sugar (9% reducing sugar) and 0.1% pectin. The material was ground and particles sieved by a Bender USS 230 strainer and dried at 80°C.

b) Sugar cane bagasse: The sugar cane bagasse was provided by Usina de Açúcar e Álcool São Domingos / Catanduva/ SP/Brasil. Chemical analysis revealed that the dry material was composed of 75% fiber, 0.5% protein, 5% nitrogen, 3.4% ash, 10.36% total sugar (3.53% reducing sugar).The material was washed in tap water and the same procedure described above was followed.

c)Wheat bran: This material was obtained commercially, dried and used untreated. Chemical analysis revealed that the dry material was composed of 8.12% fiber, 15.7% protein, 65% nitrogen, 4.57% ash, 16.7% total sugar (5.22% reducing sugar).

The substrates for fermentations consisted of sugar cane bagasse and wheat bran mixtures in proportions of 1:9 and 9:1, respectively, and of sugar cane bagasse, orange bagasse and wheat bran mixture in proportions of 1:1:1.

Solid-state fermentation (SSF) was carried out using a 250 mL Erlenmeyer flask containing 5g of sterilized substrate (120°C/40min) inoculated with 10 mL aliquots of conidia suspension (approx.10^7 spore/g dry substrate) which was obtained from a 7-day agar slant culture suspended in sterile Tween 80 solution. After inoculation, 10 mL of nutrient solution, composed of 0.1% NH_4NO_3; 0.1% $NH_4H_2PO_4$; 0.1% $MgSO_4 \times 7H_2O$, were added to each of the flasks. The final moisture content of the medium was approximately 67%.

The cultivation was carried out at 30°C for 15 days. At 24h intervals the solid fermented material, corresponding to one Erlenmeyer flask, was mixed with 30 mL of distilled water (6g of fermented material/mL), stirred for 40 min, filtered under vacuum and centrifuged. The supernatant was used as crude enzyme solution.

Enzyme activity measurements: Polygalacturonase (Pg) activity was determined by measuring the release of reducing groups from citrus pectin using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent assay (Miller, 1959). The reaction mixture containing 0.8 mL 1% citric pectin 67% methoxylated (Braspectina-Limeira/SP/Br) in 0.2M acetate buffer, pH 5.0 and 0.2 mL of crude enzyme solution, was incubated at 40°C for 10 min. One unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme which releases one µmol of galacturonic acid per minute.

Pectin lyase (Pl) activity was determined by measuring the increase in absorbance at 235 nm of substrate solution (0.8 mL 1% citric pectin in 0.2M tris-HCl buffer, pH 8.5) hydrolyzed by 0.2 mL enzyme solution, at 40°C. One unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme which releases 1 µmol of unsaturated uronide per minute, based on the molar extinction coefficient (5500) of the unsaturated products (Albersheim, 1966).The enzyme production was expressed in units per gram of initial dry solid substrate (Ug^{-1}).

Enzyme characterization: The fractions of Pg and Pl, obtained from gel filtration, were used for characterization assay.

Optimum pH and temperatures for enzyme activity: The enzyme activity was determined at 50°C, in different pH using as buffers sodium acetate (pH 3.0-5.0), citrate-phosphate (pH 5.0-7.0), tris-HCl (pH 7.0-8.5) and glycine-NaOH (pH 8.5-11.0). The optimum temperature was assayed by incubation of the reaction mixture at temperature of 30-70 °C at optimum pH.

PH and temperature stability: Enzyme solution was dispersed (1:1) in 0.2M buffer pH 3.0-5.0 (sodium acetate), pH 5.0-7.0 (citrate-phosphate), pH 7.0-8.5 (tris-HCl) and pH 8.5-11.0 (glycine-NaOH) and maintained at 25°C for 24h. An aliquot was used to determine the remaining activity at the optimum pH and temperature for enzymes. For the temperature

stability determination, the enzyme solution was incubated at different temperatures (30°C-70°C) for 1h at pH 5.0. An aliquot was withdrawn and placed on ice before assaying for residual pectinase activity at optimum pH and temperature.

RESULTS AND DISCUSSION

Production of pectinases by SSF: Initially sixteen strains of fungi recently isolated from decaying vegetable and soil sample were cultivated in the mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in proportions of 1:9 and 9:1 (medium A and B, respectively) for 15 days. Data of Table1 show that synthesis of polygalacturonase and pectin lyase by all the fungi tested depended upon the proportions of mixture used. For majority of strains (thirteen) a higher Pg activity was observed in medium B, indicating that media containing the highest pectin and nutrient concentration (wheat bran) afforded higher production of this enzyme. On the other hand, Pl production depended on the strain used. Pl activity was higher in the medium containing higher proportion of wheat bran (medium B) in fermentation using eight strains, whereas other seven strains presented higher production in medium composed by mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in proportion of 9:1(medium A).

According Silva *et al.* (2002) Pg and Pl production by *P. viridicatum* RFC3 using orange bagasse and sugar cane bagasse was influenced by media composition, reaching higher value in mixture containing wheat bran. The effect of different carbon source on pectinase synthesis by fungi in submerged and solid-state fermentation, have been studied. It is generally agreed that the optimum medium for the enhanced production of extracellular pectinase is that containing pectic materials as an inducer (Galiotou-Panayotou *et al.*, 1993 ; Crotti *et al.*, 1999).

Table1 : Production of pectinases by isolated fungi strains by FSS

Strain	Pl (U/g)		Pg (U/g)	
	A	B	A	B
Moniliellla sp SB9	16800.0	18740.0	3.2	21.0
Penicillium sp EGC5	2540.0	9250.0	8.7	11.0
Penicillium viridicatum RFC3	Nd	656.0	1.5	19.0
Penicillium glabum F1	51.0	Nd	14.4	5.1
Penicillium sp RFC 2	1002.0	Nd	7.2	10.2
Penicillium itallicum	876.0	N d	16.0	16.0
Penicillium citrinum	602.0	Nd	7.8	3.0
Curvularia inaequalis EM P11-1	372.0	Nd	8.0	15.0
Curvularia sp 5.11.1	Nd	Nd	2.0	3.0
Aspergillus sp EG66F	894.0	83.0	10.2	15.0
Aspergillus sp EGC4	330.0	1518.0	2.4	11.4
Aspergillus niger	39.0	288.0	3.6	9.0
Themoascus sp 179. 5	368.0	222.0	27.0	34.0
Aureobasidium sp RE	Nd	81.0	1.0	9.0
Phanerochaetes sp 291	Nd	720.0	6.0	21.0
Cladosporium sp RFC 1	Nd	56.0	8.4	11.0

Medium A =sugar cane bagasse 90% wheat bran 10% ; Medium B = Wheat bran 90% , sugar cane bagasse 10%

Among the fungi studied the *Moniliella* sp SB9 and the *Penicillium* sp EGC5 presented high production of Pl and considerable quantities of Pg in both medium (Tab. 1) being selected for a second stage of assays which both the fungi were cultivated in mixture composed by orange bagasse, sugar cane bagasse and wheat bran in proportion of 1:1:1. Enzyme production on SSF was analyzed during 15 days and the data of Figure 1 correspond to mean of five assays. Polygalacturonase production by *Moniliella* sp peaked between the 3th and the 4th days of cultivation, with the maximum activity of Pg 26Uxg^{-1}. The maximum Pl activity (19400 Uxg^{-1}) was observed at the 6th day (Fig. 1a). When *Penicillium* sp

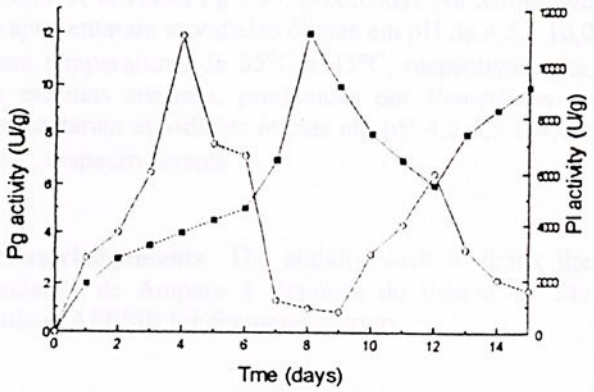
EGC5 was used maximal Pg activity (12 Uxg^{-1}) was detected at the 8th day and Pl activity, at the 4th day (11000 Uxg^{-1}) (Fig. 1b).

The addition of fibrous material as sugar cane bagasse, resulted in the interparticle spacing with a possible increase in the aeration and nutrient and enzyme diffusion, according described by Mitchell *et al.* (1991). When solely sugar cane bagasse was used as carbon source, the growth of the fungi was low (data not shown) indicating that microorganism was not able to hydrolyses cellulose and hemicellulose fibers enough to support of the mycelium formation. This supposition was confirmed by low level of cellulase (0.24 Uxg^{-1} for *Moniliella* sp and not detected in *Penicillium* sp ECG5 cultivation medium) and xilanase (15.5 Uxg^{-1} for *Moniliella* sp and 12Uxg^{-1} for *Penicillium* sp ECG5) produced in the experiments. It is supposed that the sugar cane bagasse seems to be only a solid inert support and the microorganism growth and enzyme production seems to be stimulated by wheat bran and orange bagasse addition. The use of sugar cane bagasse as inert support was suitable for the growth and pectinase production of *Aspergillus niger*, *P. viridicatum* RFC3 and *Thermoascus aurantiacus* (Oriol *et al*, 1988; Silva *et al*., 2002; Martins *et al*., 2002).

The quantities of Pg and Pl obtained in this study were high compared to those reported for pectinolytic strains such as *Aspergillus niger* (25 U Pg and 350 U Pl per gram of substrate), *P. italicum* (6U Pl/g e 25U Pg/g), *P. frequentans* (3.4 U Pg /g) and *A. foedidus* (1000 U Pl/g) cultivated on solid substrates (Garzón & Hours, 1992; Hours *et al*., 1994; Castilho et al, 2000). However, the comparison of the amounts of enzyme produced by different organisms is not absolutely adequate, because different culture conditions have been used.

These results showed that SSF was suitable to pectinase production by the several fungi strains studied and that solid-state fermentation may be achieved using agricultural and agro-industrial by-product.

1a



1b

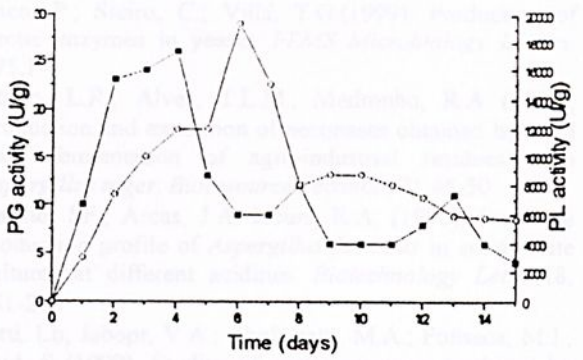


Figure 1: Pectinase production by *Moniliella sp SB9* (a) *and Penicillium sp EGC5* (b) on orange bagasse, sugar cane bagasse and wheat bran mixture (1: 1:1). full Symbol = Polygalacturonase ; open symbol =Pectin lyase

Enzyme characterization: Characterization of fraction of the polygalacturonase and pectin lyase obtained from *Moniliella* sp SB9 and *Penicillium* sp EGC5 cultivation was carried out. Pg from *Moniliella* sp exhibited maximum activity at pH 4.5 and Pl, at pH 10.0, whereas Pg and Pl from *Penicillium* sp EGC5 presented optimum pH at 4.5-5.0 and 9.0, respectively. Enzymes from *Moniliella* were stable at pH 3.0-10.0 (Pg) and 4.0-7.0 (Pl) and their activity was preserved in 70% when maintained at 60°C for 1 h. Pg from *Penicillium* sp was stable at pH range of 3.0-8.0 and maintained 70% of initial activity at 70°C. Pl produced

by this microorganism was stable in acidic to neutral pH (4.0-7.0) and was stable in temperature lower than 40°C (Table 2).

The physico-chemical characteristics of pectinases from microorganisms studied were similar those reported for several fungal species (Riou *et al*, 1992, Ryazanova *et al*, 1996, Blanco *et al*., 1999).

Table 2: Characteristics of pectinase produced by *Moniliella* sp SB9 and *Penicillium* sp EGC5 on SSF

Characteristics	*Moniliella* sp SB9		*Penicillium* sp EGC5	
	Pg	Pl	Pg	Pl
Optimum pH	4.5	10.0	4.5-5.0	9.0
Optimum temperature (°C)	55	45	40	40
pH range which preserving 70-100% of initial activity	3.0-10.0	4.0-7.0	3.0-8.0	4.0-5.0
Temperature range (°C) which preserving 70-100% of initial activity	10-60	10-60	10-70	10-40

The present work showed that is feasible to use agro-industrial agro-industrial by-products for the polygalacturonase and pectin lyase production by newly isolated fungi. These fungi were able to produce extracellular polygalacturonase and pectin lyase during the solid state fermentation.

RESUMO

A produção de pectina liase e poligalacturonase por linhagens de fungos filamentosos isolados, foi estudada através de fermentação em estado sólido utilizando subprodutos agro-industriais. Os fungos *Moniliella* sp SB9 e *Penicillium* sp EGC5 produziram consideráveis quantidades de Pg e Pl em substrato composto por mistura de bagaço de laranja, bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo (1:1:1). A enzimas Pg e Pl, produzidas por *Moniliella* sp apresentaram atividades ótimas em pH de 4,5 e 10,0 e em temperaturas de 55°C e 45°C, respectivamente. As mesmas enzimas, produzidas por *Penicillium* sp apresentaram atividades ótimas em pH 4,5-5,9 e 9,0 e 40°C, respectivamente.

Acknowledgements: The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

REFEERENCES

Albersheim, P.(1966), Pectin lyase from fungi. *Methods Enzymol*., 8,628-631

Blanco, P.; Sieiro, C.; Villa, T.G.(1999), Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 175,1-9

Castilho, L.R.; Alves, T.L.M.; Medronho, R.A (2000), Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol*., 71,45-50

Cavalitto, SF.; Arcas, J.A. Hours, R.A, (1996), Pectinase production profile of *Aspergillus foedidus* in solid state cultures at different acidities. *Biotechnology Letter*,18, 251-256

Crotti, Lb; Jabopr, V.A.; Chellegatti, M.A.; Fonseca, M.J.; Said, S (1999), Studies of pectic enzymes produced by *Talaromyces flavus* in submerged and solid substrate cultures. *J. Basic Microbiol*., 39, 227-35

Galiotou-Panayotou, M.; Rodis, P.; Kapantai, M (1993), Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin. *Letters Apll. Microbiol*., 17, 145-148

Garzón, C.G. and Hours, R.A (1992). Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. *Biores. Technol*., 39,93-95

Gomes, E. ; Iembo, T.; DA Silva, R. (2001), Production, characterization and properties of depolymerising enzymes from a *Curvularia inaequalis* strains, *Folia Microbiologica*, 46, 303-308

Hours, R.A.; Voget, C.E.; Ertola, R.J (1988). Some factories affecting pectinase production from apple pomace in solid states cultures. *Biological wastes*., 24,147-157

Martins, E.S., Silva, DA Silva, R.; Gomes, E. (2000), Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochem*.,37, 949-954

Miller, G.L. (1959), Use of dinitrossalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem.*, 31:426-428,.

Mitchell, D.A.; Do, D.D.; Greenfield, P.F.; Doelle, H.W. (1991), A semi-mechanistic mathematical model for growth of *Rhizopus oligosporus* in a model solid-state fermentation system. *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 353 62

Oriol, E. ; Schettino, B.; Viniegra-Gonzales, G.; Raimbaut, M. (1988), Solid-state culture of *Aspergillus niger* on support. *J. Ferment. Technol.*, 66,57-62

Pandey, A.; Soccol, C.R.; Nigam, P.; Soccol, V.T. (2000), Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugar cane bagasse. *Bioresource Technol.*, 74,69-80

Pilnik, W.; Voragen, A.G.J. (1993), Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufature. *In:* Nagodawithama, T.; Reed, G. (eds). *Enzymes in Food Processing*,. Academic Press, New York, p 363-399.

Riou, C.; Freyssinet, G.; Feure, M. (1992), Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum. Appl. Env. Microbiol.*, 58,578-583

Ryazanova, L.P.; Mikhaleva, N.I.; Solov'eva, I.V.; Boev, A.V.; Okunev, O.N.; Kulaev, I.S. (1996), Pectolytic enzymes from *Aspergillus heteromorphus. Appl. Biochem. Microbiol.*, 32,1-6

Sarkanen, S. (1991), Enzymatic lignin degradation: An extracellular view, *In*: Leathem, G.F.;. Himmel, M.E. (eds). *Enzymes in Biomass Conversion*, ACS Symp. Series 460, *American Chem. Soc.*, Whashington, p.247-269

Silva, D., Martins, E. S., Silva, R., Gomes, E (2001). Pectinase production from *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural residues and agro-industrial by-product. *Braz. Jf Microbiol., (in press).*

Soares, M.M.C.N.; Da Silva, R.; Gomes, E (1999) Screening of bacterial strains for pectinolytic activity characterization of the Pgase produced by *Bacillus species. Rev Microbiol.*, 30, 229-303

Soares, M.M.C.N.; Da Silva, R.; Carmona, E.C.; Gomes, E (2001), Pectinolytic enzymes production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 17,79-82

Zhen, Z. ; Shetty, K (2000), Solid state production of polygalacturonase by Lentinus edodes using fruit processin wastes. Process Biochem., 35, 825-830

Utilização de Resíduos Agro-industriais para Produção de Pectinases por *Penicillium viridicatum RFC3*

Denis Silva[1], Márcia Luzia Rizzatto[2], Eduardo da Silva Martins[1], Roberto Da Silva[1] e Eleni Gomes[1]

[1]Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada - Universidade Estadual Paulista (Unesp) - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Rua Cristovao Colombo, 2265, cep 15054-000, Jd. Nazareth, e-mail: denisbio@yahoo.com.br

[2]Unicamp – Departamento de Engenharia de Alimentos

RESUMO

Pectinases são enzimas que degradam a molécula de pectina por diversos mecanismos. A produção das enzimas Exo-PG e PL produzidas pelo P. viridicatum RFC3 através da fermentação semi-sólida de substratos como os bagaços de banana e cana, cascas de manga e banana, farelo de trigo além da polpa de maçã e do tegumento do grão de milho, durante 15 dias (amostras a cada 48h) mostraram que a maior produção de Exo-PG ocorreu a 288h de cultivo em farelo de trigo (1,62 U/mL), e em 144h (1,15 U/mL), quando combinado o bagaço de cana. O farelo de trigo também foi capaz de induzir produção da PL (144h – 90,34 U/mL). Quando o bagaço de cana foi misturado aos substratos, houve aumento da produção das enzimas , sendo o combinado bagaço de cana e casca de manga, o meio que proporcionou a maior produção de PL (100,34 U/mL – 336h).

INTRODUÇÃO

O aproveitamento de resíduos agrícolas para obtenção de um produto de valor comercial, através de um processo fermentativo sólido (FSS), poderia ser visto como uma tentativa de se agregar valores a um produto de descarte, possibilitando uma fonte de renda alternativa para propriedades rurais, cumprindo assim, uma função ambiental e social (HOLZAPFEL, 2002, MOTARJEMI, 2002). Os microrganismos podem produzir uma grande variedade de enzimas hidrolíticas extracelulares em FSS como pectinases, celulases, amilases, proteases entre outras (SILVA *et al.*, 2002 e SATO e SUDO, 1999).

As pectinases produzidas podem ser classificadas de acordo com o modo de atuação na molécula de pectina podendo ser subdividida em: Poligalacturonases (PG) que hidrolisam as ligações glicosídicas internas (α-1,4) entre os resíduos de ácidos galacturônicos, causando a despolimerização da molécula. A ação dessa enzima é acompanhada pelo aumento de açúcares redutores no meio. Pectina-liases (PL) que são enzimas despolimerizantes e quebram a ligação glicosídica por mecanismo de trans-eliminação de hidrogênio a partir da ligação entre os carbonos da posição 4 e 5 do ácido galacturônico. Sua ação é acompanhada por um aumento da absorbância a 235nm devido à formação de dupla ligação, entre aqueles carbonos, que serve para monitorar a atividade enzimática (WHITAKER, 1990). Este trabalho teve por objetivos estudar a produção de pectinases (PG e PL) através da fermentação em estado sólido, utilizando como substrato os resíduos agrícolas e agroindustriais (farelo de trigo, bagaço de cana e laranja, casca de banana, manga, tegumento do grão de milho e polpa de maçã) por *P. viridicatum RFC3*, além de avaliar o efeito do tempo de fermentação sobre a produção das enzimas.

MATERIAL E MÉTODOS

1-Microrganismo

O microrganismo estudado, o *Penicillium viridicatum* RFC3, foi isolado a partir de amostra de hortaliça em decomposição e foi identificado pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", Campinas –SP.

2- Substratos para o estudo da produção das enzimas

Foram testados os seguintes resíduos agrícolas e agro-industriais: bagaço de laranja, bagaço de cana, casca de banana, manga e polpa de maçã, farelo de trigo; resíduo do processamento de milho (tegumento do grão). Os resíduos foram secos a 65°C por 24h e autoclavados a 121°C por 30 minutos.

4-Inóculo

A cultura esporulada (em ágar inclinado) foi suspensa em solução de Tween 80 a 0,01% procedendo-se a contagem do número de esporos em suspensão, utilizando câmara de Neubauer. Foram utilizados volumes de suspensão suficientes para se obter um inóculo de 10^7 esporos por grama de substrato.

5-Estudo da produção da enzima em fermentação semi-sólida.

A fermentação semi-sólida, para a produção das pectinases ocorreu em erlenmeyers de 250 mL contendo 10g dos resíduos citados anteriormente, devidamente secos e moídos. Após o inoculo com 10^7 esporos por grama de substrato, ocorreu à hidratação até 80% de umidade, com a solução nutriente composta por $(NH_4)_2SO_4$ a 0,1% e $MgSO_4$ x $7H_2O$ a 0,1%. O material foi incubado em estufa a 28 °C, com amostras coletadas a cada período de 48 horas, durante 15 dias. As enzimas foram extraídas pela adição de 8mL de água por grama de substrato, o qual foi homogeneizado e mantido em agitação a 100rpm por 30 minutos. O material foi filtrado a vácuo a fim de se obter a solução enzimática bruta.

6-Medida da atividade enzimática

6.1. Atividade de Poligalacturonase (PG)

A atividade de PG foi avaliada numa mistura contendo 0,8 mL de tampão acetato 0,2M, pH 5,0, contendo 1% de pectina com 64-72% de esterificação e 0,2 mL de enzima. O açúcar redutor liberado (ac. D-galacturônico) após a incubação da mistura de reação a 55°C por 10 min., foi quantificado pelo método do DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido galacturônico por minuto, nas condições de reação.

6.2. Atividade de Pectina liase (PL)

A mistura de reação para determinar atividade de PL foi de 0,5 mL de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5, contendo 1% de pectina com 64 - 72% de esterificação e 0,5 mL de enzima. A incubação foi a 55°C por 30 min. e a interrupção da reação ocorreu por adição de 10 mL de

HCl a 0,2N. A quantificação dos produtos foi feita pela leitura da absorbância a 235nm segundo o método de Albersheim (1966). Uma Unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que promove liberação de 1µmol de uronídeos insaturados por minuto, nas condições de reação. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 5500.

7-Análise estatística dos experimentos

Foram feitas análises de variância através de um delineamento fatorial 5X7 (*Resíduos Agrícolas X Tempo*), 5X6 (*Resíduos Combinados com Bagaço de Cana X Tempo*) para a produção de Exo-PG e PL . Os desdobramentos das médias das atividades das enzimas foram feitos através do teste de Tukey.

Os dados foram analisados utilizando-se o programa ***Estat*** (de livre distribuição), desenvolvido pelos Drs. Sergio do Nascimento Kronka e David Ariovaldo Banzatto, na Unesp de Jaboticabal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Produção de PG e PL em resíduos agro-industriais e análise fatorial dos dados.

1.1. Poligalacturonase

Numa primeira etapa, foram estudados como substratos para as fermentações, os resíduos e sub-produtos agroindustriais, farelo de trigo, bagaço de laranja, casca de banana e manga, polpa de maçã e tegumento do grão de milho. As fermentações foram desenvolvidas por 15 dias, sendo tomadas amostras a cada 48h. os resultados da produção de PG foram analisados estatisticamente por análise fatorial 6X7 (Resíduos X Tempo de cultivo).

Observou-se que, os substratos afetaram a produção da enzima, a 1% de probabilidade, segundo o teste F, enquanto que o tempo de cultivo não apresentou diferença significativa, a 5% de probabilidade. A combinação desses fatores mostrou que a interação não foi capaz de produzir uma diferença significativa, a 5% de probabilidade, na produção da enzima. Foi aplicado o teste de Tukey para o fator "substrato" e "tempo de cultivo". O teste revelou que o farelo de trigo, proporcionou uma maior produção da enzima em relação aos demais resíduos, com uma média de 1,62 U/mL. Para o fator tempo de cultivo, o teste de Tukey revelou que a maior média de produção da enzima foi obtida a 288h de cultivo (0,7042 U/mL), embora sem significância estatística (Tab. 1).

A segunda etapa do trabalho consistiu na produção de PG utilizando os resíduos citados anteriormente, exceto a polpa de maçã, os quais foram acrescidos de bagaço de cana na proporção 1:1 (p/p). A análise de variância desses dados mostrou que existiu efeito significativo, a 1% de probabilidade apenas para o tipo de resíduo usado, sobre a produção da enzima.

Foi aplicado o teste de Tukey para o fator "substrato combinado com o bagaço de cana" e "tempo de cultivo". O teste revelou que o farelo de trigo associado ao bagaço de cana, proporcionou uma maior produção da enzima em relação aos demais resíduos, com uma média de 2,36 U/mL. Para o fator tempo de cultivo, o teste de Tukey revelou que a maior média de produção da enzima foi obtida a 144h com 1,15 U/mL, embora sem significância estatística (Tab. 2). Esses resultados indicaram que a produção da PG por *P. viridicatum RFC3* deve ser feita em farelo de trigo, por períodos de fermentação mínimos de 144 horas.

unesp

Tabela 1: Teste de Tukey para as médias de produção de Exo-PG resíduos agro-industriais utilizados nos ensaios fermentativos ao longo do período fermentativo.

Resíduos	*Δ (0,7458)*	Tempo Cultivo (horas)	*Δ (0,8359)*
Farelo de trigo	$1,6214^{A}$	**288**	$0,7042^{A}$
Tegumento de milho	$0,7000^{B}$	**192**	$0,6750^{A}$
Bagaço de laranja	$0,4143^{B}$	**96**	$0,6500^{A}$
Casca de banana	$0,3643^{B}$	**240**	$0,6125^{A}$
Casca de manga	$0,2786^{B}$	**48**	$0,4875^{A}$
Polpa de maçã	$0,0571^{B}$	**144**	$0,4750^{A}$
		336	$0,4042^{A}$

Tabela 2: Teste de Tukey para as médias das atividades de Exo-PG obtidas pelo cultivo de *P. viridicatum* RFC3 na mistura dos resíduos com bagaço de cana ao longo do período fermentativo.

Resíduos Combinados	*Δ (0,4831)*	Tempo Cultivo (horas)	*Δ (0,6214)*
Farelo de trigo + b. c.	$2,3607^{A}$	***144***	$1,1500^{A}$
Bagaço de laranja + b. c.	$0,8393^{B}$	***192***	$1,0100^{A}$
Casca de banana + b. c.	$0,7929^{B}$	***240***	$0,9550^{A}$
Tegumento de milho + b. c.	$0,4607^{BC}$	***288***	$0,9500^{A}$
Casca de manga + b. c.	$0,2393^{C}$	***96***	$0,9300^{A}$
		336	$0,9200^{A}$
		48	$0,6550^{A}$

*** b. c. (bagaço de cana)**

1.2. Pectina liase

Os dados obtidos no estudo da produção de PL foram analisados estatísticamente da mesma maneira que a PG, quanto aos fatores substratos usados na fermentação (farelo de trigo, bagaço de laranja, casaca de banana, casca de manga e maçã) e tempo de cultivo (amostras tomadas a cada 48 horas). A análise de variância dos dados não indicou efeito significativo dos substratos usados, nem dos tempos de cultivo, ao nível de 5% de probabilidade, sobre a produção da enzima. Da mesma forma, não se obteve significância para as interações entre os fatores "substrato" e "tempo". O mesmo comportamento foi notado para a produção da enzima com os resíduos combinados com o bagaço de cana. Os testes de Tukey mostraram que o farelo de trigo novamente foi o melhor para produção da enzima (90,34 U/mL) a 144 h (85,95 U/mL). Quando os resíduos foram combinados com o bagaço de cana, notou-se um aumento na produção da enzima e a casca de manga mostrou-se melhor substrato para produção da PL, seguido do bagaço de laranja (101,35 U/mL) num tempo de 336 h (100,34 U/mL) (Tab. 3 e 4).

Tabela 3: Teste de Tukey para as médias de produção de PL, resíduos agro-industriais, utilizados nos ensaios fermentativos ao longo do período ferme ntativo.

Resíduos	*Δ (103,7747)*	Tempo Cultivo (horas)	*Δ (116,3014)*
Farelo de trigo	$90,3493^{A}$	***144***	$85,9525^{A}$
Bagaço de laranja	$85,6836^{A}$	***96***	$77,9000^{A}$
Casca de banana	$75,4429^{A}$	***240***	$56,1933^{A}$
Polpa de maçã	$21,0664^{A}$	***288***	$40,7767^{A}$
Casca de manga	$18,2721^{A}$	***192***	$38,5967^{A}$
Tegumento de milho	$14,5093^{A}$	***336***	$38,1333^{A}$

		48	*18,6583*^{A}

Tabela 4: Teste de Tukey para as médias das atividades de PL, obtidas pelo cultivo de *P. viridicatum* RFC3 na mistura dos resíduos com bagaço de cana ao longo do período fermentativo.

Resíduos Combinados	*Δ (77,3427)*	Tempo Cultivo (horas)	*Δ (116,3014)*
Casca de manga + b. c.	*101,3500*^{A}	*336*	*100,3420*^{A}
Bagaço de laranja + b. c.	*69,5557*^{A}	*240*	*93,0990*^{A}
Casca de banana + b. c.	*61,3986*^{A}	*144*	*57,7460*^{A}
Farelo de trigo + b. c.	*49,2421*^{A}	*288*	*57,6470*^{A}
Tegumento de milho + b. c.	*29,2579*^{A}	*192*	*43,4200*^{A}
		48	*42,7470*^{A}
		96	*40,1260*^{A}

*** b. c. (bagaço de cana)**

O meio de fermentação influenciou significativamente na produção das enzimas nos diversos resíduos agrícolas analisados, principalmente em relação a Poligalacturonase, cujos ensaios mostraram o farelo de trigo como melhor indutor da enzima. A PL além do farelo de trigo, teve o bagaço de laranja como bom indutor. Esses resultados assemelham-se com os obtidos para endoglucanases e β - glucosidases (GRAJEK, 1987), xilanases (TREJO-HERNANDEZ *et al.*, 1991) e pectinases produzidas por *Aspergillus niger*, usando os mesmos meios de fermentação (ACUÑA-ARGÜELLES *et al.*, 1995).

Além da fonte de carbono, o tempo de cultivo foi um fator que influenciou, embora sem significância estatística, a produção da PG nos diversos substratos. Os resultados mostram ainda que o *P. viridicatum RFC3*, quando cultivado separadamente em diversos resíduos, apresentou pico de produção média da Exo-PG em 288 horas de cultivo. Esses substratos quando misturados com o bagaço de cana tiveram seu pico de produção diminuído pela metade (144 horas). Para a PL o pico de produção média ocorreu em 144 horas de cultivo quando os resíduos foram estudados separadamente, entretanto, quando a mistura foi utilizada, ocorreu o inverso, com um aumento no tempo de produção máxima da enzima para 336 horas. Esse efeito do tempo de cultivo na produção das enzimas assemelha-se ao descrito por Acuña-Argülles *et al.* (1995) e Hang e Woodams (1994).

A mistura de um substrato inerte como o bagaço de cana-de-açúcar (esse substrato não é utilizado pelo microrganismo) foi um fator que favoreceu a produção de pectinases, principalmente naqueles substratos como as cascas de banana e manga, caracterizados pelo alto teor de açúcares e pela forte compactação das partículas quando umedecidas. O uso do bagaço de cana-de-açúcar propiciou uma melhor penetração das hifas no meio fermentativo, devido provavelmente, à redução da compactação, o que também pode ter facilitado a oxigenação e possivelmente a troca de calor. Segundo Ooiijkaas *et al.* (2000) e Silva *et al.* (2002) a presença de um substrato inerte no meio fermentativo favorece a homogeneidade da umidade, devido ao melhor controle da evaporação. Embora nossos dados tenham indicado que a adição do bagaço de cana aos substratos avaliados tenha aumentado a produção da pectinases, as razões pelas quais isso ocorreu, ainda são especulativas visto que não houve, nos ensaios, controle de fatores como o crescimento microbiano, umidade de substrato ou temperatura do sistema.

CONCLUSÕES

- A fonte de carbono foi um dos fatores que possivelmente interferiram na repressão e/ou indução da PG e Pl, produzidas pelo fungo.

- O tempo de fermentação influenciou a produção da PG e PL pelo *P. viridicatum RFC3,* quando cultivado em diferentes resíduos agro-industriais, embora não tenha havido diferenças significativas nas produções médias ao longo do percurso fermentativo.
- Os resíduos farelo de trigo e bagaço de laranja foram os substratos que proporcionaram maiores produções de PG e PL
- A mistura de resíduos com bagaço de cana-de-açúcar elevaram as produções médias de PG e PL, quando comparados com as produções nesses substratos isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuña-Argüelles, M. E., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G., Favela-Torres, E. (1995), Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology,* v.43, p.808-814.

Albersheim, P., (1996), Pectin lyase from fungi. *Methods Enzymol.*, v.8, p.628-631.

Grajeck, W. (1987), Comparative studies on the production of cellulases by thermophilic fungi in submerged and solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 26, p. 126-129.

Hang, Y.D.; Woodanms, E.E. (1994), Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. Lebensm. *Wiss. U. Techno.*, v. 27, p.194-196.

Holzapfel, W.H. (2002), Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, v. 75, p. 197-212.

Miller, G.L. (1959), Use of dinitrolssalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428.

Motarjemi, Y. (2002), Impact of small-scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, v. 75, p. 213-229.

Ooijkaas, L. P.; Weber, F. J., Buitelaar, R. M.; Tramper, J.; Rinzema, A. (2000), Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends in Biotechnology*, v. 18, p. 356-360.

Sato, K.; Sudo, S. (1999), Small-scale solid-state fermentations. Cap 5, pag 61-79. In: Demain, A. L.; Davies, J. E. (ed); *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.* ASM Press, 2 ed, Washington, D.C.

Silva, D.; Martins, E. S.; Da Silva, R.; Gomes, E. (2002), Pectinase production from P*enicillium viridicatum* rfc3 by solid state fermentation using agricultural residues and agro-industrial by-product. *Brazilian Journal of Microbiology*, (in press).

Trejo-Hernandez, M. R.; Oriol, E.; Lopez-Canales, A.; Roussos, S.; Viniegra, G.; Raimbault, M. (1991), Prodiction of pectinases by *Aspergillus niger* by solid state fermentation on support. *Micol. Neotrop. Appl.,* v. 4, p. 49-62.

Whitaker, J. R. (1990), Microbial pectolytic enzymes. In: Forgaty, W. M.; Kelly, C. T. (ed) *Microbiol enzymes and biotechnology.* 2 ed. London: Elsevier, cap. 4, p. 133-176.

Estudo do Tempo de Cultivo na Produção de Pectinases por *Penicillium* sp EGC5 e *Moniella* sp 9SB em Fermentação Semi-Sólida (FSS) de Resíduos Agrícolas.

Natalia Martin, Roberto Da Silva e Eleni Gomes[1]

[1]Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada – UNESP/IBILCE – Deptº de Biologia
Caixa Postal 136 – CEP 15054-000 São José do Rio Preto – SP E-mail: nmartin@bol.com.br

RESUMO

Os fungos produzem diferentes enzimas extracelulares com atividades pectinolíticas, as quais são de grande importância nos processos industriais, onde são usadas para a clarificação de sucos de frutas, macerações de vegetais, produção de vinhos e na indústria têxtil. Este trabalho teve por finalidade definir melhor tempo de cultivo para produção das enzimas exo-poligalacturonase (exo-PG), endo-poligalacturonase (endo-PG), pectinaliase (PL) e pectinaesterase (PE), assim como, a produção de enzimas hemi-celulolíticas e amilolíticas pelos fungos Moniella sp 9SB e Penicillium sp EGC5 em fermentação semi-sólida (FSS). O fungo Penicillium sp EGC5 apresentou apenas um pico para a produção de exo-PG, endo-PG e PL enquanto que o fungo Moniella sp 9SB mostrou dois picos para a produção de exo-PG, um para a endo-PG e três para a PL. As duas linhagens foram capazes de produzir xilanase, CMCase, avicelase e amilase. Não foi detectada a atividade de pectinesterase em nenhuma das duas linhagens.

INTRODUÇÃO

A fermentação semi-sólida (FSS) é uma técnica eficiente para a produção de enzimas pectinolíticas. A FSS, conforme definida por Pandey (2002), é um processo fermentativo que ocorre na ausência ou próximo da ausência de água livre, usando um substrato sólido natural como substrato ou suporte inerte. Este processo possui algumas vantagens como: processo simples e de baixo custo; maior concentração de produtos formados; fácil extração dos produtos, podendo ser feita com água e dispensando o uso de solventes; especial interesse em países com abundância de biomassa e de resíduos agro-industriais;

A utilização de resíduos agro-industriais como o bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja, na produção de enzimas microbianas vem sendo testado por vários autores, os quais demonstraram que os mesmos podem ser convertidos em diversos produtos e são usados como fonte de carbono para crescimento microbiano (Couri et *al.* 2000; Soares et *al.*, 2001; Martins et *al.* 2002).

Pectinases são um grupo de enzimas que degradam a pectina por diferentes modo de ação, sendo as desesterificantes (pectinesterase), as despolimerizantes (hidrolases e liases) e as protopectinases. Sua classificação ainda pode ser baseada na preferência pelo substrato, como o ácido péctico ou pectato, que são os ácidos poligalacturônicos que não apresentam metoxilação e o ácido pectínico ou pectina, que são os ácidos poligalacturônicos que contêm quantidades variáveis de grupos metoxílicos (Alkorta et *al*, 1997).

As enzimas pectinolíticas têm intensa aplicação na indústria de alimentos, atuando principalmente na produção de sucos e vinhos, na maceração de vegetais (Bravo et *al.* 2000). Nesses processos as pectinases facilitam a extração, melhora o rendimento e atuam na clarificação e estabilidade de sucos concentrados. As pectinases também são usadas na extração de óleos vegetais, fermentação do chá e café e na extração de fibras têxteis

(Kashyap, et *al.* 2001). Na industria têxtil atuam na maceração do material hemicelulolítico que resulta em separação das fibras de celulose da parede vegetal (Da Silva, et *al.* 1997).

MATERIAL E MÉTODOS

1- Microrganismo

Os microrganismos estudados, o *Penicillium sp* EGC5 e *Moniella sp* 9SB foram isolados a partir de amostra de hortaliça em decomposição.

2- Estudo da produção da enzima em fermentação semi-sólida

Nos estudos de seleção de substrato para a produção de pectinases por FSS, foram utilizados o bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja industrializado e farelo de trigo misturados na proporção de 1:1:1 (p/p). Os meios foram hidratados com água até 80% de umidade considerando o volume de água a ser adicionada junto com inóculo e o da solução composta por $(NH_4)_2SO_2$ a 0,2% e $MgSO_4x7H_2O$ a 0,1% que foi usada como suplemento nutricional dos substratos.

A fermentação semi-sólida ocorreu em erlenmeyers de 250 mL contendo 5g do resíduo citado anteriormente, devidamente seco e moído. A cultura esporulada (em ágar inclinado) foi suspendida em solução de Tween 80 a 0,01%. Após a hidratação com a solução nutriente (item 2.2) o material foi inoculado com 10^7 esporos por grama e incubado estufa a 30° C. As amostras foram obtidas retirando-se um frasco de material fermentado a cada 24 horas, durante 360 horas.

3- Medida da atividade enzimática das pectinases

A atividade de exo-PG foi avaliada numa mistura contendo 0,8 ml de tampão acetato 0,2M, pH 5,0, contendo 1% de pectina com 64-72% de esterificação e 0,2 ml de enzima. O açúcar redutor liberado (ácido D-galacturônico) após a incubação da mistura de reação a 55°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 1 µmol 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 citrato-fosfato a pH 5,5, contendo pectina, de forma que a concentração final do substrato fosse de 1,5%. As misturas de reação foram incubadas por dez minutos nas mesmas temperaturas utilizadas para a reação de Poligalacturonase. A viscosidade da mistura de reação foi determinada utilizando-se o viscosímetro basic da Fungilab, em temperatura de 25°C. O controle foi feito usando mistura de enzima inativada, tampão e pectina em iguais proporções da amostra. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade necessária para reduzir em 50% a viscosidade da solução nas condições de ensaio.

A mistura de reação para determinar atividade de PL foi composta de 0,4 ml de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5, contendo 1% de pectina com 64 - 72% de esterificação e 0,2 ml de enzima. A incubação foi feita a 65°C por 30 min. e a interrupção da reação ocorreu por adição de 10 ml de HCl a 0,2M. A quantificação dos produtos foi feita pela leitura da absorbância a 235mn segundo o método de Albersheim (1966). Uma unidade de PL foi definida como a quantidade de enzima que promoveu a liberação de lµmol de uronídeos insaturados por minuto, nas condições de reação. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 5550.

A atividade da PE foi medida por quantificação do metanol liberado enzimáticamente a partir das moléculas de pectina, através de método colorimétrico. A reação enzimática ocorreu em mistura composta por 0,2 mL de solução enzimática bruta e 0,8 mL de tampão citrato-fosfato 0,2M pH 5,0, contendo 1% de pectina, incubada em temperatura a 45°C por 10

minutos. Uma unidade de PE foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de metanol por minuto nas condições de reação.

4- Medida da atividade de Amilase

A atividade da amilase foi medida através da mistura de reação que constou de 0,8 mL de tampão- fosfato, 0,2M, pH 5,0 contendo 0,3% de amido, com 0,2 mL de enzima. A mistura foi incubada a 45°C por 10 minutos. O açúcar redutor liberado, após a incubação, foi quantificado pelo método do DNS e uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de glicose por minuto nas condições de ensaio.

5- Atividade de Hemi-celulases

A atividade da xilanase foi medida através da mistura de reação composta por 0,2 mL do extrato enzimático bruto e 1,8 mL de uma solução de 0,5% de xilana (Birchwood-Sigma) em tampão acetato 0,2M e pH 5,0. A incubação foi feita em temperatura de 45°C por 10 minutos. Os açúcares redutores foram quantificados pelo método do DNS. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de xilose por minuto nas condições de ensaio.

As atividades da avicelase e CMCase foram determinadas pelo mesmo método da atividade da xilanase, exceto pelo uso de celulose microcristalina (avicel) (Sigma Co) e carboximetilcelulose (CMC-Sigma). As substâncias redutoras formadas foram quantificadas pelo método do DNS. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária pata liberar 1µmol de glicose por minuto nas condições de ensaio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Tempo de cultivo na produção de pectinases por fermentação semi-sólida (FSS)

O cultivo das linhagens fúngicas em meio contendo mistura de bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja e farelo de trigo, ao longo de 360 h, mostrou que as mesmas foram capazes de produzir quantidades significativas de exo-PG, endo-PG e PL.

Em fermentações desenvolvidas pela linhagem fúngica *Moniella* sp 9SB, as atividades de poligalacturonases (exo e endo) apresentaram-se em dois picos, em 48 horas e 168 horas de cultivo, respectivamente, enquanto a atividade de PL apareceu em três picos, em 48, 144 e 336 horas de fermentação. As maiores produções das enzimas exo-PG (84,8 U/g) e endo-PG (3,42 U/g) ocorreram em 48 horas, enquanto que a atividade máxima de PL (9080 U/g) foi obtida em 144 horas (Figs. 1, 2 e 3).

A linhagem fúngica *Penicillium* sp EGC5, produziu um máximo de exo-PG (13 U/g) em 192 horas, de endo-PG (4 U/g), em 48 horas e de PL (4870 U/g) em 168 horas. Ao longo do percurso fermentativo, a linhagem mostrou apenas um pico de atividade de exo-PG e PL e dois picos de atividade de endo-PG (Figs. 1, 2 e 3).

As duas linhagens não produziram quantidades de pectinaesterase detectáveis durante todo o período fermentativo.

Quando comparadas as duas linhagens, percebe-se que as produções de endo-poligalacturonases, em ambas, foram muito semelhantes, entretanto, o fungo *Moniella* sp 9SB foi capaz de produzir quantidades maiores de exo-PG e PL do que o fungo *Penicillium* sp EGC5.

Cabe destacar que o substrato utilizado para medir as atividades das pectinases foi pectina com 64-72% de esterificação, ou seja, pectina com alto grau de esterificação. Desse modo, foram determinadas as atividades de pectinasese que têm afinidade por essas substâncias, em detrimento de quantificação das atividades de poligalactironases e pectato liases, as quais poderiam também estar presentes no meio de cultivo de ambos os fungos.

De acordo com Castilho et al. (2000) o fungo *A. niger* produziu, através de FSS usando misturas de farelo de trigo e farinha de soja, 7,5 U/g de PG. Zengh, Shetty (2000) utilizaram *Lentinus edodes,* em FSS da polpa de morango e obtiveram uma produção de PG de 29,4 U/g e quando utilizou polpa de maçã, obtiveram 20,1 U/g. Soares et *al.* (2001), através de FSS de farelo de trigo, utilizando cinco linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Bacillus*, obtiveram 40 U/g da atividade máxima de exo-PG e o valor obtido da PL foi de 1000 U/g. Martins et *al.* utilizaram o fungo *Thermoascus aurantiacus*, em FSS de bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, obtiveram uma atividade máxima de PL de 40180 U/g e a de exo-PG de, 43 U/g.

A comparação dos dados aqui apresentados com aqueles da literatura, indicam a viabilidade do uso das cepas *Moniella* sp 9SB e *Penicillium* sp EGC5 para a produção de pectinases por FSS. Deve-se ressaltar, no entanto, que as comparações entre os dados experimentais nem sempre são consistentes, visto as variações de métodos de fermentação, extração das enzimas, quantificação e expressão das atividades enzimáticas.

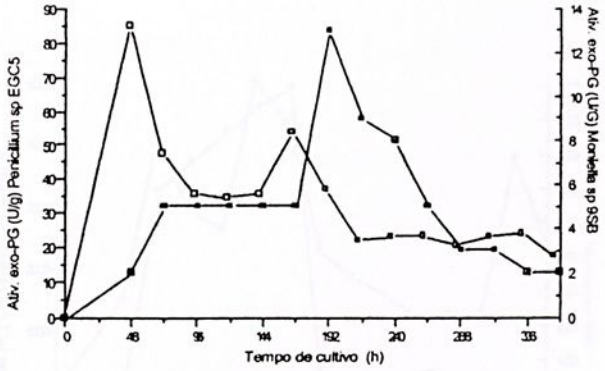


Fig. 1. Produção de exo-PG, em função do tempo de cultivo, em fermentação semi-sólida (FSS), pelas linhagens fúngicas *Moniella* sp 9SB (□) e *Penicillium* sp EGC5 (■), em meio composto por mistura de bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja e farelo de trigo (1:1:1).

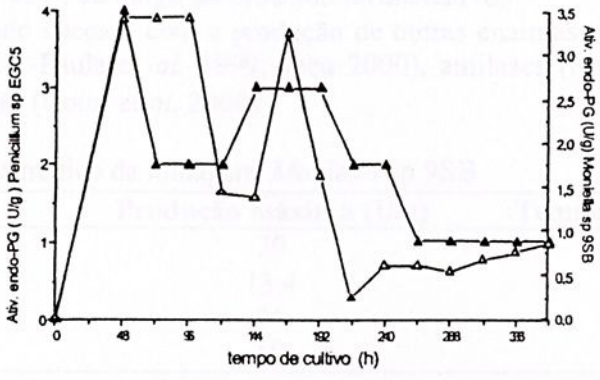


Fig. 2. Produção de endo-PG, em função do tempo de cultivo, em fermentação semi-sólida (FSS), pelas linhagens fúngicas *Moniella* sp 9SB (8) e *Penicillium* sp EGC5 (7), em meio composto por mistura de bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja e farelo de trigo (1:1:1).

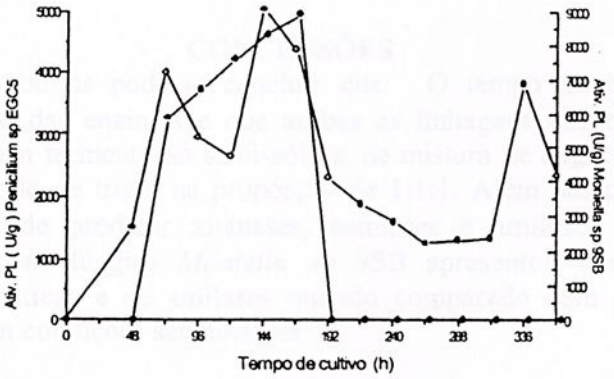


Fig. 3. Produção de PL, em função do tempo de cultivo, em fermentação semi-sólida (FSS), pelas linhagens fúngicas *Moniella* sp 9SB (○) e *Penicillium* sp EGC5 (●),em meio composto por mistura de bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja e farelo de trigo (1:1:1).

2. Perfil enzimático

A linhagem *Moniella* sp 9SB também foi capaz de produzir outras enzimas despolimerizantes, como a xilanase (30 U/g) detectada após 168 horas de cultivo, CMCase (13,4 U/g), em 72 horas, avicelase (24 U/g), em 288 horas e a amilase (59 U/g), em 96 horas de cultivo (Tab. 1).

Produções máximas de xilanase (17 U/g) e de CMCase (5 U/g) foram obtidas por *Penicillium* sp EGC5 em 168 horas, enquanto que a de avicelase (2 U/g) ocorreu em 72 horas. A atividade máxima de amilase (10 U/g) foi obtida em 96 horas (Tab. 2).

Ao compararmos as linhagens na produção de enzimas despolimerizantes, nota-se que o fungo *Penicillium* sp EGC5 produziu menores quantidades de celulases, xilanases e amilases que o fungo *Moniella* sp 9SB, ao longo do processo fermentativo.

Alguns autores têm tido sucesso com a produção de outras enzimas hidrolíticas através da FSS, como celulases (De-Paula et *al.* 1999; Jecu 2000), amilases (Mulimani et *al.* 2000; Rabalho 2002) e xilanases (Couri et *al.* 2000)

Tab. 1. Perfil enzimático da linhagem *Moniella* sp 9SB

Enzima	Produção máxima (U/g)	Tempo de Cultivo (h)*
Xilanase	30	168
CMCase	13,4	72
Avicelase	24	288
Amilase	59	96

* Tempo de cultivo em horas no qual foi observado a produção máxima.

Tab. 2. Perfil enzimático da linhagem *Penicillium* sp EGC5

Enzima	Produção máxima (U/g)	Tempo de Cultivo (h)*
Xilanase	17	168
CMCase	5	168
Avicelase	2	72 – 144
Amilase	10	96

* Tempo de cultivo em horas no qual foi observado a produção máxima.

CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos pode-se concluir que: O tempo de cultivo foi um fator importante na produção das enzimas e que ambas as linhagens, mostraram-se capazes de produzirem pectinases em fermentação semi-sólida, de mistura de bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de laranja e farelo de trigo, na proporção de 1:1:1. Além das pectinases, ambos os fungos foram capazes de produzir xilanases, celulases e amilases durante o processo fermentativo. A linhagem fúngica *Moniella* sp 9SB apresentou maiores produções de pectinases, hemi-celulolíticas e de amilases quando comparado com a linhagem fúngica *Penicillium* sp EGC5 em condições semelhantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albersheim, (1966), Pectin lyase from fungi. *Methods Enzymol.*, v. 8, p. 628-631, 1966.

Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J. and Serra, J. L. (1997), Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, v. 33, p. 21-28.

Bravo, C. E. C.; Carvalho, E. P.; Schwan, R. F.; Gómez, R. J. H. C.; Pilon, L. (2000), Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. *Ciênc. Agrotec.*, v. 24, p. 137-152.

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

Couri, S.; Terzi, S. C.; Pinto, G. A. S.; Freitas, S. P.; Costa, A. C. A. (2000) Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 255-261.

Da Silva, R.; Franco, C. M. L.; Gomes, E. (1997), Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. *Bol. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 31, p. 249-260.

De-Paula, E. H.; Ramos, L. P.; Azevedo, O. M.; (1999) The potential of Humicola grisea var. thermoidea for bioconversion of sugar cane bagasse, *Bioresource Technology*, Volume 68, Issue 1, Pages 35-41.

Fogarty, W. M.; Ward, O. P. (1972) Pectic substances and pectinolytic enzymes. *Process Biochemistry*, p. 13-17.

Jecu, L. (2000) Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Industrial Crops and Products* v. 11, p. 1-5.

Kashyap, D. R.; Vohra, P. K.; Chopra, S.; Tewari, R. (2001) Applications of pectinases in the commercial setor: a review. *Bioresource Technology*, v. 77, p. 215-227,.

Martins, E. S.; Silva, D.; Da Silva, R.; Gomes, E. (2002) Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 949-954.

Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, nº 3, p. 426-428.

Mulimani, U. H.; Patil, G. M., Randingo, M. (2000) α-amilase production by solid state fermentation *Biochem.* Ed, v 28, p. 161-163.

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

Rabalho, A. A., (2002) Isolamento de linhagens microbianas amilolíticas termofílicas: produção, caracterização e aplicação da enzima bruta na hidrólise do amido de mandioca. *Dissertação apresentada à UNESP de São José do Rio Preto*, para obtenção do título de Mestre.

Soares, M. M. C. N.; Da Silva, R.; Carmona, E. C.; Gomes, E. (2001) Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 17, p. 79-82.

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

Seleção de Substratos para Produção de β-Glicosidase em Estado Sólido pelo Microrganismo *Thermoascus aurantiacus*

Rodrigo Simões Ribeiro Leite, Heloísa Ferreira Alves Prado, Eleni Gomes, Roberto da Silva.

Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada
IBILCE / UNESP – São José do Rio Preto
E-mail: simoesbio@hotmail.com

RESUMO

A β-glicosidase é uma enzima que hidrolisa a celobiose e outras celodextrinas à glicose, assumindo um papel fundamental na hidrólise da celulose. A ação sinergística das enzimas endoglucanase e avicelase sobre a molécula de celulose resulta a formação de celobiose, que será reduzida à glicose pela β-glicosidase. Neste trabalho o fungo Thermoascus aurantiascus foi cultivado em diferentes substratos sólidos ricos em material hemi-celulósico para a produção de β-glicosidase. Dentre estes a produção de β-glicosidase foi significativa nos meios com farelo de trigo, farelo de soja, casca de soja e sabugo de milho. Em seguida a produção da enzima foi estudada em função do tempo, outros parâmetros também foram analisados neste ensaio como as atividades de protease, xilanase, endoglucanase, avicelase e o pH final da fermentação. O meio de farelo de trigo foi o mais adequado para a produção de β-glicosidase, apresentando atividade 7,0 U/ml em 72 horas de fermentação.

INTRODUÇÃO

O crescente aumento da população mundial requer que novas fontes de produção de alimentos e energia sejam desenvolvidas, sendo, nesse sentido, importante a utilização da celulose, a fonte de energia renovável mais abundante da Terra. Os produtos da hidrólise de materiais celulósicos podem ser utilizados como substratos em processos fermentativos para obtenção de produtos alimentícios, combustíveis líquidos ou outras substâncias químicas de interesse econômico (Rodrigues, 1987).

A hidrólise enzimática de material celulósico até glicose envolve a ação sinergística de no mínimo três diferentes enzimas: endo-β-1-4-glucanase (EC 3.2.1.4), exo-celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) e a β-glicosidase (EC 3.2.1.21) (Coughlan, 1985; Woodward et al., 1985, Da Silva et at., 1997).

As enzimas endoglucanases e exo-celobiohidrolases atuam sobre a celulose produzindo celobiose como produto final (Coughlan, 1985). A principal função da β-glicosidase, comumente chamada de celobiase, é a hidrólise da celobiose e outras celodextrinas à glicose, reduzindo o efeito inibidor da celobiose sobre as enzimas endoglucanases e exo-celobiohidrolases (Nadalini, 1997). Por prevenir o acúmulo do dissacarídeo, a β-glicosidase é responsável pelo controle da velocidade global da reação de hidrólise celulósica, desempenhando assim, um efeito crucial na degradação enzimática da celulose (Sengupta et al., 1991).

Uma outra utilidade desta enzima é a sua capacidade de degradar antocianinas produzindo antocianidinas e açúcar livre. A aglicona resultante tem pouca cor e é menos solúvel que a

antocianina, tendendo a ser rapidamente precipitada e facilmente removível durante a filtração. Isto é importante na indústria de sucos, porque evita a alteração na cor que ocorreria com a presença de antocianinas durante o processo de pasteurização do suco (Palma-Fernandez et al., 2002). Este efeito também é responsável pela suavização da coloração do vinho tinto durante a fabricação deste.

A β-glicosidase também apresenta ação hidrolítica sobre as isoflavonas (isoflavonóides glicosídicos) presentes na soja, liberando as agliconas daidzeina, genisteina e gliciteina (Matsuura, et al., 1989, Park et al., 2001). Estudos revelam que estas agliconas possuem efeitos preventivos e inibitórios em casos de câncer de mama e próstata (Peterson & Barnes, 1991, 1993).

A síntese da β-glicosidase por microrganismos depende de diversos fatores como: tempo de cultura, presença de compostos indutores no meio e um nível intracelular adequado de nutrientes e minerais (Palma-Fernandez, 2002).

Fungos e bactérias são capazes de produzir enzimas celulolíticas por fermentações submersas (SmF) ou por fermentações no estado sólido (SSF) (Persson et al., 1991). Atualmente tem crescido a atenção para as fermentações no estado sólido, visto que esta apresenta algumas vantagens sobre as fermentações submersas (Fernandez et al.,1996), como baixo capital e custo operacional, requer pouco espaço físico, necessita de equipamentos simples para o desenvolvimento do processo e evita o consumo excessivo de água durante a produção enzimática (Kalogeris et al., 2003).

Um dos maiores obstáculos na aplicação comercial da fermentação no estado sólido está na produção de biorreatores capazes de operar em larga escala (Ashley et al., 1999). Algumas dificuldades ainda não foram completamente superadas como a transferência de massa e a remoção do calor (Fujian et al., 2002).

Um dos maiores entraves para a exploração comercial das celulases é o elevado custo de produção. A alta produtividade, aliada com a redução do custo na produção, torna o processo de fermentação no estado sólido uma tecnologia promissora para a produção de celulases (Krishma, 1999).

Este trabalho tem por finalidade o estudo parcial de alguns parâmetros envolvidos na produção de β-glicosidase, em fermentação sólida, em diferentes substratos hemicelulolíticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 11 diferentes tipos de substratos ricos em hemicelulose, sendo estes, farelo de trigo, farelo de soja, casca de soja, casca de arroz, serragem, bagaço de cana, sabugo de milho, palha de milho, papel, papelão e jornal.

MICRORGANISMO: Foi utilizado o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* Miehe, isolado de madeira em decomposição em Manaus (AM), Brasil (Da Silva, 1992), mantido em ágar Sabouraud.

FERMENTAÇÃO: Todos os substratos foram devidamente lavados com água destilada e posteriormente secos em estufa a 50°C por 48 horas.

A fermentação se deu em erlenmeyers de 500 ml com 5 g de substratos umedecidos com 5 ml de solução salina 0,1% de sulfato de amônia, 0,1% de sulfato de magnésio hepta-hidratado e 0,1% de nitrato de amônia. O material foi esterilizado a 121°C durante 20 minutos. Após a inoculação, a fermentação ocorreu a uma temperatura de 50°C por 120 horas.

INOCULO: O microrganismo foi cultivado em erlenmeyers de 250 ml contendo 40 ml do meio ágar Sabouraud Dextose inclinado, mantido por 48 horas a uma temperatura de 50°C. A resuspensão do microrganismo foi realizada com 25 ml de solução salina 0,1% (descrita anteriormente) devidamente esterilizada. A inoculação do fungo no substrato se deu pela

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

transferência de 3 ml desta resuspensão para os erlenmeyers contendo os meios de produção previamente preparados.

EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA: Para a extração da enzima foram adicionados 50 ml de água destilada nos erlenmeyers fermentados, o micélio do fungo foi macerado e passadas 2 horas foi realizada uma filtração (papel de filtro n°. 1 Whatmam), obtendo assim o filtrado enzimático bruto, para determinação das atividades enzimáticas.

Produção enzimática em função do tempo de fermentação:

Neste experimento foram utilizados os substratos que apresentaram uma maior eficiência na produção de β-glicosidase pelo microrganismo, farelo de trigo, farelo de soja, casca de soja e sabugo de milho.

Amostras das fermentações foram retiradas de 24 em 24 horas, perfazendo um total de 144 horas. Além da atividade de β-glicosidase, outros parâmetros foram analisados, como as atividades de endoglucanase, avicelase, xilanase e protease e também a variação do pH durante o processo fermentativo.

ATIVIDADE ENZIMÁTICA: A atividade de β-glicosidase foi determinada com 50 µL do filtrado enzimático, 250 µL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 e 250 µL de 4-nitrofenol β-glicopiranosideo 4µM (PNPG, Sigma), reagindo por 10 minutos a uma temperatura de 60°C, a reação enzimática foi paralisada com 2 ml de carbonato de sódio 2 M e quantificadas por espectrofotometria com λ de 410 nm.

As atividades das enzimas xilanase, endoglucanase e avicelase foram medidas através da quantidade de açúcar redutor presente no final da reação enzimática, sendo quantificado pelo método de DNS (3,5-ácido dinitrosalisílico). Foram utilizadas xilana, CMC e avicel como substratos para as respectivas enzimas (Miller, 1959).

A atividade de protease foi quantificada com 200 µL de caseína 0,5% em água destilada, 200 µL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 e 100 µL do filtrado enzimático, reagindo por 1 hora a uma temperatura de 60°C. A reação foi paralisada com 1 ml de TCA (ácido tricloroacético) 10% e precipitada por 30 minutos no banho de gelo. A absorbância devido a liberação de aminoácidos foi quantificada por espectrofotometria com λ de 280nm.

O teor total de proteína das amostras foi quantificado através do método de Hartree-Lowry, utilizando soro albumina bovina como padrão (Lowry et al., 1951).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade necessária de enzima capaz de liberar 1 µmol dos respectivos produtos por minuto de reação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram estudados diversos substratos, em diferentes tempos de cultivo, que supostamente estimulassem o microrganismo a produzir a enzima β-glicosidase.

Nossos resultados confirmam dados obtidos anteriormente por Palma-Fernandez (2002) revelando que o microrganismo *Thermoascus aurantiacus* é um excelente produtor de celulases em fermentação sólida.

Dentre os 11 substratos testados, os que apresentaram um maior potencial para a produção da β-glicosidase foram; farelo de trigo, farelo de soja, casca de soja e sabugo de milho, o microrganismo não apresentou um crescimento satisfatório nos outros substratos testados e atividade β-glicosídica não foi detectada nestes (tabela I).

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

Substratos	crescimento	Atividade de β-glicosidase (µmol/ml)	Atividade Específica (U/mg)
Farelo de trigo	+++	4,6	1,4
Farelo de soja	+++	4,3	0,25
Casca de soja	+++	1,8	1,2
Sabugo de milho	+++	1,5	1,0
Palha de milho	+	----	----
Bagaço de cana	+	----	----
Serragem	ND	----	----
Papel sulfite	ND	----	----
Jornal	ND	----	----
Caca de arroz	ND	----	----
Papelão	ND	----	----

Tabela I: Crescimento +++ Bom, ++ Regular, + Pouco, ND Não Detectado.

Trabalhos anteriores reportam uma boa produção enzimática e um ótimo crescimento do fungo em derivados de trigo e sabugo de milho (Palma-Fernandez, 2002; Kalogeris et al., 2003).

Produção enzimática em função do tempo de fermentação:

Nos quatro substratos utilizados nestes experimentos, observou-se uma tendência de aumento do pH durante o processo fermentativo, foram mais expressivos entre 48 e 96 horas de fermentação, posteriormente a estes aumentos não houve maiores alterações, exceto em farelo de soja, que apresentou um decréscimo constante após 48 horas de fermentação (gráfico I). A variação do pH é causada pela atividade metabólica do microrganismo, podendo aumentar ou diminuir de acordo com o que é liberado ou consumido no meio de cultivo (Raimbault, 1998).

O microrganismo apresentou uma maior produção de β-glicosidase em farelo de trigo, obtendo cerca de 7,0 UI em 72 horas de fermentação, após este pico, a produção enzimática diminuiu progressivamente até atingir 4,7 UI em 144 horas de fermentação (gráfico II). Os dados obtidos apresentam similaridade aos resultados obtidos por Kalogeris em 2003, utilizando palha de trigo como substrato para o mesmo microrganismo; quando comparado a ensaios utilizando *Aureobasidum sp.* em farelo de trigo, estes resultados são consideravelmente maiores (Iembo et al., 2002).

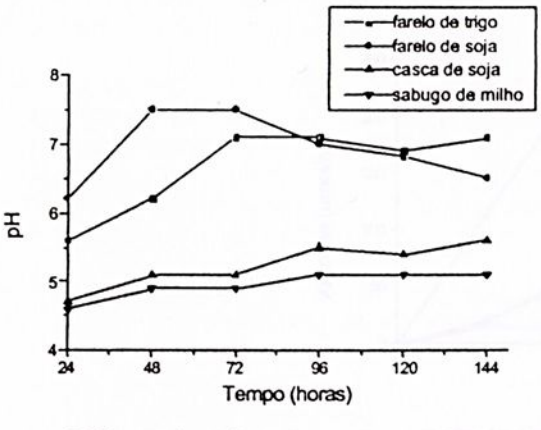


Gráfico I: Variação do pH durante o processo de fermentação.

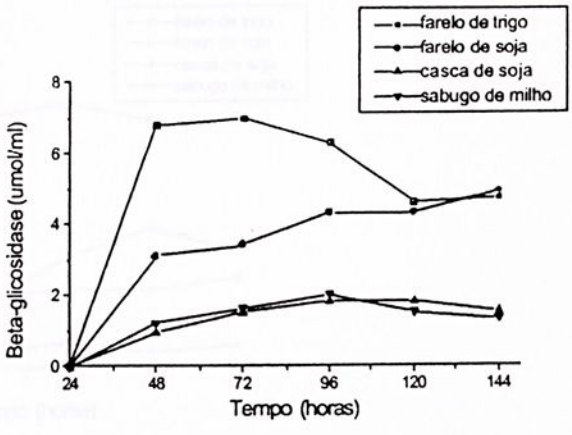


Gráfico II: Atividade de β-glicosidase em função do tempo de fermentação.

O farelo de trigo também foi o melhor substrato para a produção das outras enzimas analisadas, atingindo picos de produção de 47,1 UI para endoglucanase e 7,7 UI para avicelase, sendo o único substrato que estimulou o fungo a produzir esta ultima enzima (gráficos III e IV). A produção do presente trabalho foi maior que a produção obtida por Palma-Fernandez (2002), com o mesmo microrganismo em farelo de trigo. Esta maior produtividade pode ser justificada pela adição da solução de sais para umedecer o substrato durante a fermentação, o que provavelmente enriqueceu o meio com algum mineral não presente no farelo de trigo. Também foi constatado visualmente, que o crescimento do fungo usando a solução salina (este trabalho) foi melhor que quando se usa apenas água destilada (trabalho de Palma-Fernandez) para umedecer o substrato. Em seu trabalho Palma-Fernandez não determinou a curva de produção enzimática em função do tempo, obtendo dados de tempo univariável de 120 horas. Além disso, ela usou apenas água destilada para umedecer seus substratos, concluindo no final que sabugo de milho foi seu melhor substrato. Assim foi interessante verificar a influencia do tempo e da solução salina na produção enzimática. Os dados obtidos estão apresentados no presente trabalho.

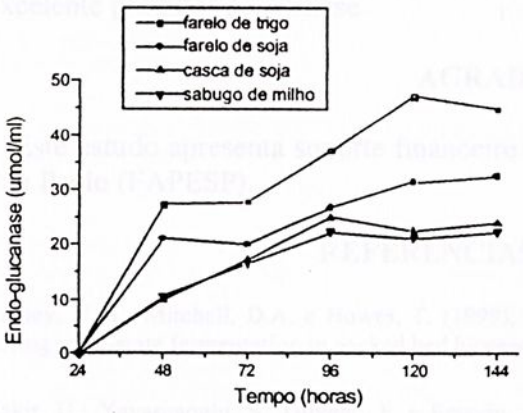


Gráfico III: Atividade de endoglucanase em função do tempo de fermentação.

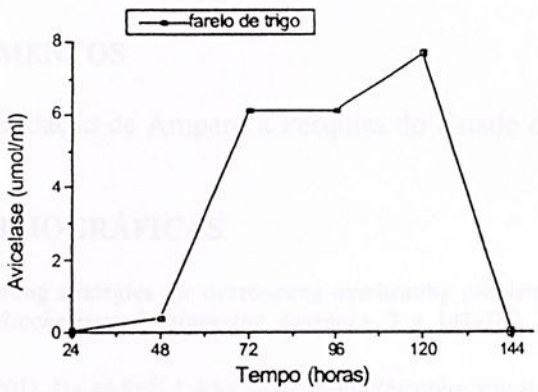


Gráfico IV: Atividade de avicelase em função do tempo de fermentação.

O microrganismo apresentou uma excelente produção de xilanase nos quatro substratos que foram utilizados, sendo que em farelo de trigo o fungo atingiu sua maior produção que foi 233,1 UI em 96 horas de fermentação (gráfico V).

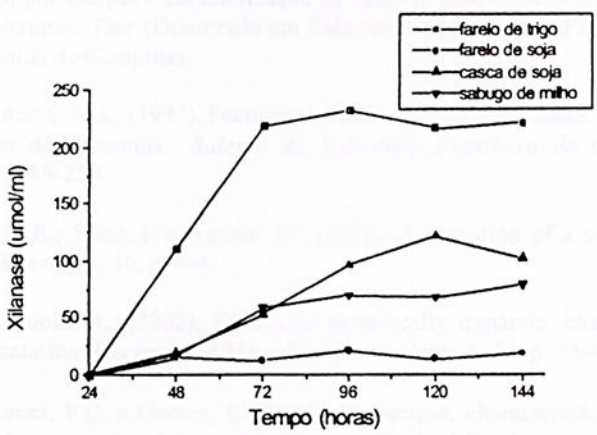


Gráfico V: Atividade de xilanase em função do tempo de fermentação.

Bakir em 2001 obteve resultados similares com o microrganismo *Rhizopus oryzae* em fermentação sólida. Kalogeris em 1998 em um experimento piloto com *Thermoascus aurantiacus* utilizando palha de trigo como substrato obteve resultados muito próximos aos obtidos no presente trabalho. O mesmo autor com a otimização do processo fermentativo conseguiu uma produção consideravelmente maior. Os dados reforçam os resultados obtidos por Silva em 1992, de que o microrganismo é ótimo produtor de xilanase.

A produção de protease foi praticamente inexistente quando comparada com as demais enzimas analisadas neste trabalho, não apresentando relação com o decréscimo das atividades enzimáticas.

CONCLUSÕES

Concluímos com este trabalho que o melhor substrato para produção de β-glicosidase pelo microrganismo *Thermoascus aurantiacus* é o farelo de trigo. O tempo de produção 72 horas, também é baixo para a média obtida por fungo, o microrganismo também apresenta um grande potencial para a produção de endoglucanase, avicelases e destaca-se como um excelente produtor de xilanase.

AGRADECIMENTOS

Este estudo apresenta suporte financeiro da Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ashley, V.M.; Mitchell, D.A. e Howes, T. (1999), Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. *Biochemistry Engineering Journal* v. 3, p. 141-150.

Bakir, U.; Yavascaoglu, S.; Guvenc, F. e Ersayin, A. (2001), Na endo-β-1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae* : production, partial purification and biochemical characterization. *Enzyme and Microbial Technology* v. 29, p. 328-334.

Coughlan, M.P. (1985), The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotech. Genet. Engineer.Review's* v. 3, p. 39-109,.

Da Silva, R. (1992), Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de *Humicola sp.* 179-5 e aplicação destas enzimas. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Da Silva, R.; Gomes, E. e Franco C.M.L. (1997), Pectinases, hemicelulases e celulases substrato, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 31, p. 249-250.

Fernandez, M.; Perez-Correa, J.R.; Solar, I. e Agosin, E., (1996), Automation of a solid substrate cultivation pilot reactor. *Bioprocess Engineering* v. 16, p. 1-4.

Fujian, X.; Hongzhang, C. e Zuohu, L. (2002), Effects of periodically dynamic changes of air on cellulase production in state-solid fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* v. 30, p. 45-48.

Iembo, I.; Da Silva, R.; Pagnocca, F.C. e Gomes, E. (2002), Production, characterization, and properties of β-glucosidase and β-xylosidase from a strain of *Aureobasidium sp*. *Applied Biochemistry and Microbiology* v. 38, n. 6, p. 549-552.

Kalogeris, E.; Christakopoulos, P.; Kekos, D. e Macris B.J. (1998), Studies on the solid-substrate production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. *Journal of Biotechnology* v. 60, p.155-163.

Kalogeris, E.; Iniotaki, F.; Topakas, E.; Chriskopoulos, P.; Kekos, D. e Macris, B.J. (2003), Performance of intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. *Bioresource Technology*, v. 86, p. 207-213.

Krishna, C. (1999), Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresource Technology*, v. 69, p.231-239.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farra, L.; Randall, R.J. (1951), Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol.Chem.* v. 193, p. 267-275.

Matsuura, M.; Obata, A. e Fukushima, D. (1989), Objectionable flavor of soymilk developed during the soaking of soybeans and its control. *Journal Food Science*, Chicago, v. 54, n. 3, p. 602-605.

Miller, G.L. (1959), Use of dinitrossalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428.

Nadalini, M.F.C. (1997), *Caracterização genética e produção de celulases em Trichoderma pseudokoningii*. Rio Claro. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

Palma-Fernandez, E.R.D. (2002), *Purificação e caracterização de duas β-glicosidase do fungo termofílico Thermoascus aurantiascus Miehe*. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

Palma-Fernandez, E.R.D.; Gomes, E. e Da Silva, R. (2002), Purification and Characterization of two β-Glucosidases from Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus Miehe*. *Folia microbioloca*, v. 47, n. 6, p. 685-690.

Park, Y.K.; Aguiar, C.L.; Alencar, S.M. e Scamparini, A.R.P. (2001), Biotransformação de isoflavonas de soja. *Biotecnol. Cien. Desenvolv.* V. 20, p. 12-14.

Persson, I.; Tjerneld, F. e Hahn-Hangerdal, B. (1991), Fungal cellulolytic enzime production: a review. *Process Biochem.* V. 26, p. 65-74.

Peterson, G. e Barnes, S. (1991), Genistein inhibition of the growth of human breast cancer-cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, San Diego, v.179, n.1, p.661-667.

Peterson, G. e Barnes, S. (1993), Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal factor receptor tyrosine autophosphorylation. *The Prostate*, New York, v.22,n.4, p.335-345.

Raimbault, M. (1998), General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* v.1, n.3, p.174-188.

Rodrigues, E.C. (1987), *Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico Humicola sp.* Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Sengupta, S. e Ghosh, A.K. (1991), Purification and characterization of a β-glucosidase enzymes from a mushroom Termitomyces clypeatus. *Biochim. Biophys. Acta v.* 1076, p.215-220.

Smith, M.K. e Gold, M.H. (1979) *Phanerochaete chrysosporium* β-glucosidases: Induction, cellular localization and physical characterization. *Appl.Environ. Microbiol.*, v.37, p.938-942.

Woodward, J. e Arnold, L. (1982), The inhibition of β-glucosidase activity in *Trichoderma reesei* C-30 cellulase by derivaties and isomers of glucose. *Biotechnol. Bioeng*. V.23, n.7, p.1553-1562.

Estudo da Variação de Temperatura em Reator de Coluna com Diferentes Densidades Aparentes em Fermentação Semi-sólida para Produção de Pectinases

Márcia Luzia Rizzatto[1], Dênis Silva[2], Eleni Gomes[2], Ranulfo Monte Alegre[1]

1Universidade Estadual de Campinas - Depto. de Engenharia de Alimentos
Caixa Postal 6121 - 13083-970 Campinas - SP - e-mail marciarizzatto@terra.com.br
2Universidade Estadual Paulista - Depto. Biologia
Caixa postal - São José do Rio Preto - SP

RESUMO

O controle da temperatura no substrato é muito importante na SSF para germinação dos esporos, o crescimento e a esporulação dos microrganismos, metabolismo e a produção de enzimas. O objetivo deste trabalho foi de estudar as variações de temperatura, a influência da densidade aparente do leito semi sólido na produção das enzimas exo e endo – poligalacturonase por Penicillium italicum IZ 1584, utilizando de bagaço de laranja como substrato. Utilizou-se reatores de coluna encamisados e as fermentações tiveram duração de 7 dias, a 28°C. O meio de fermentação foi enriquecido de sais nutrientes (NH_4NO_3, KH_2PO_4 e $MgSO_47H_2O$) e com umidade final de 55%. Foram utilizadas densidades aparentes (430, g/L; 522g/L; 570g/L; 665g/L e 760g/L) e as medidas de temperatura foram feitas usando termopares de cobre constantã (Tipo T) distribuidos ao longo do reator e um voltímetro que fornecia as leituras de temperaturas. No meio com menor densidade aparente (430g/L) a temperatura atingiu 31,9°C no centro da coluna e no meio com maior densidade aparente (760g/L) temperatura de 36,2°C. A análise da atividade da exo-pectinase, realizada pela quantificação dos grupos redutores, expressos como ácido galacturônico pelo método de Somogyi, revelou valor máximo de 264 U/g no sexto dia de fermentação com densidade aparente de 430 g/L, a endo - pectinase, calculada em centipoase, através da porcentagem de redução da viscosidade da amostra em relação ao controle, teve valor máximo de 738 U/g no quinto dia de fermentação com a mesma densidade aparente.

INTRODUÇÃO

Segundo PANDEY et al. (2000) a fermentação semi-sólida é definida como um processo que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre, usando substrato natural ou inerte como suporte sólido. Este mesmo autor afirma que o processo da SSF possui vantagem no bioprocesso e na produção de vários produtos. Devido a baixa atividade de água os microrganismos mais utilizados são os fungos (ZHENG e SHETTY, 2000). Vários resíduos agro-industriais são utilizados como substrato, como bagaço de laranja (RIZZATTO, 1999), farelo de trigo e de arroz (KAPOOR, 2000), farelo de soja (CASTILHO, 2000), polpa de maçã (BEROVIC E OSTROVERSNIK, 1997), polpa de café (BOCCAS, 1994), etc. Após a preparação do substrato semi-sólido para o processo de fermentação, este pode sofrer variação na sua natureza fazendo com que ocorra variação na densidade aparente, causando uma compactação no meio semi-sólido. Essa compactação pode vir a limitar o processo fermentativo em reatores de coluna, dificultando a transferência de calor e massa em reatores de escala industrial. Este problema depende de vários fatores como o tipo de substrato e biorreator utilizado, assim como a acomodação do leito fixo. As enzimas pectinolíticas são

largamente empregadas nas indústrias de alimentos; são usadas na produção de vinhos e sucos de frutas, onde seu uso acarreta vantagens, como aumento da qualidade do suco livre. Em indústria têxtil pode ser usada durante o processamento de fibras naturais de celulose, onde a degomagem das fibras requer pectinases livres de celulases. Elas também podem ser usadas no preparo de alimentos infantis, na maceração enzimática de vegetais durante a produção de néctar e polpa de fruta ou de vegetais.

MATERIAL E MÉTODOS

1- Microrganismo e sua manutenção

O microrganismo utilizado foi o fungo *Penicillium italicum* IZ 1584, obtido junto ao Instituto Zimotécnico, ESALQ/USP, Piracicaba, S.P. A manutenção foi feita através de repiques em tubos de ensaio contendo meio ágar-batata-dextrose (BDA) inclinado, os quais foram incubados a 28°C após a inoculação. Depois de cinco dias foram mantidos em estoque em tubos de ensaio contendo óleo mineral.

2- Meio de cultivo para produção de enzimas

Os meios de cultivo para a SSF foram definidos a partir do meio utilizado por HENNIES (1996) e RIZZATTO (1999). Nos meios de fermentação foram utilizados bagaço de laranja como substrato, enriquecidos com soluções de nutrientes minerais: NH_4NO_3, KH_2PO_4 e $MgSO_4.7H_2O$.

3- Inóculo

O inóculo para a SSF foi preparado pela adição de tween 80 0,01% aos tubos de ensaio contendo a cultura do fungo *P. italicum* IZ 1584 desenvolvida por 7 dias a 28°C, em meio BDA. As suspensões de esporos foram obtidas após raspagem do ágar com alça de inoculação, seguida de agitação manual.

4- Estudo da variação da temperatura com diferentes densidades aparentes

Foram usados fermentadores de coluna com leito fixo, construídos de vidro pirex de 50 mm de diâmetro e 300 mm de altura. Em cada fermentador foi colocado bagaço de laranja triturado adicionado de sais e inoculado com esporos do fungo. Os constituintes do meio foram pesados e preparados em embalagens flexíveis e a autoclavagem foi realizada a 121°C por 30 minutos. Após resfriamento, os meios foram inoculados com a suspensão de esporos (10^7 esporos/g), homogeneizados e transferidos assepticamente para os fermentadores. Foram utilizados vários pesos de substrato para determinação das densidades aparentes.

Para obter as várias densidades, foi utilizado uma massa de meio conhecida, um vibrador e um bastão para transferir o substrato para os reatores. Foram realizados 5 ensaios para cada valor de densidade para diminuição dos erros nas medidas. As medidas de temperatura foram feitas usando termopares de cobre-constantã (Tipo T), dispostos ao longo da coluna em diferentes alturas e um voltímetro que fornecia as leituras de temperaturas. O ar injetado na base da coluna foi saturado com vapor de água estéril e este passou por um rotâmetro para controle de sua vazão, sendo injetado no fermentado através de um distribuidor construído de aço inoxidável, de maneira a minimizar a formação de caminhos preferenciais. A temperatura da água que circulava pela camisa do fermentado foi mantida a 28°C.

5- Medida da atividade enzimática

5.1- Atividade de exo-Poligalacturonase (exo-PG)

Uma alíquota de solução enzimática bruta (0,5 ml) foi misturada a 0,5 ml de solução de pectina cítrica 0,1% em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,5 e incubada em banho-maria à

temperatura constante de 40°C durante 20 minutos. A quantificação dos grupos redutores, expressos como ácido galacturônico, foi realizada pelo método de SOMOGIY (1952). Uma unidade da atividade (UI) foi definida como µmol de ácido galacturônico produzido por grama de material fermentado úmido (UI/g MFU).

5.2- Determinação da atividade de endo-Poligalacturonase (endo-PG)

A atividade de Endo-PG foi determinada utilizando-se o viscosímetro Visco Basic (Fungilab) numa mistura de reação composta por 5,3 ml de tampão citrato-fosfato 0,2M pH 6,0 com pectina a 3%, 0,7mL de tampão citrato-fosfato 0,2M pH6,0 e 2mL da solução enzimática. O controle constou da mesma mistura, porém com a enzima inativada. A medida foi realizada em centipoase, e determinou-se a porcentagem de redução da viscosidade da amostra em relação ao controle. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 50% da viscosidade da solução em dez minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram realizados vários ensaios de fermentação com densidades aparentes diferentes (430g/L, 522g/L, 570g/L, 665g/L e 760g/L). Para todos os ensaios foram mantidas todas as condições normais de fermentação. Para o controle da temperatura os meios foram aerados com ar saturado de 20 L/h à temperatura de 28°C, água a 28°C no encamisamento da coluna e umidade do meio de 55%. Em todos os ensaios as temperaturas foram monitoradas com termopares distribuídos ao longo do reator.

As Figuras I, II, III, IV e V mostram os perfis de temperatura ao longo da fermentação. Pode-se observar que as temperaturas ao longo das fermentações foram maiores nos ensaios com densidades aparentes maiores. O meio com menor d_{ap} (430g/L) apresentou temperatura de 31,9°C no centro da coluna e o meio com maior dap (760 g/L) temperatura de 36,2°C, um aumento de 4,3°C.

A simples comparação dessas figuras, mostra a importância do sistema de controle de temperatura, pois com a maior densidade aparente (d_{ap}=760g/L), ou a maior compactação do meio, a aeração arrastava o meio de forma pistonada, interrompendo assim a dissipação do calor metabólico gerado.

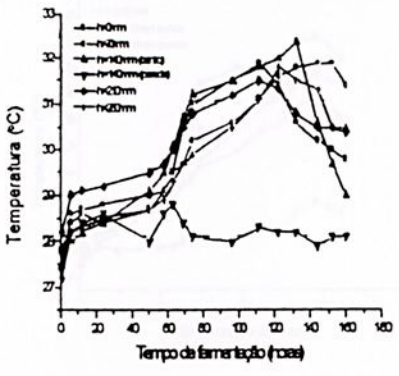


Figura I. Perfis de temperatura das diversas alturas do leito semi-sólido em função da densidade aparente do meio (d_{ap}=430g/L)

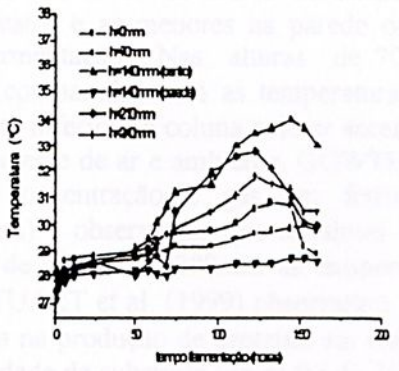


Figura II. Perfis de temperatura das diversas alturas do leito semi-sólido em função da densidade aparente do meio (d_{ap}=522g/L)

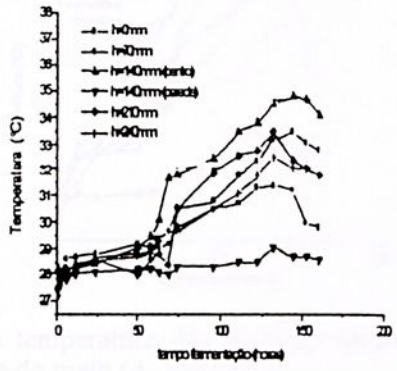


Figura III. Perfis de temperatura das diversas altura (h) do leito semi-sólido em função da densidade aparente do meio (d_{ap}=570g/L)

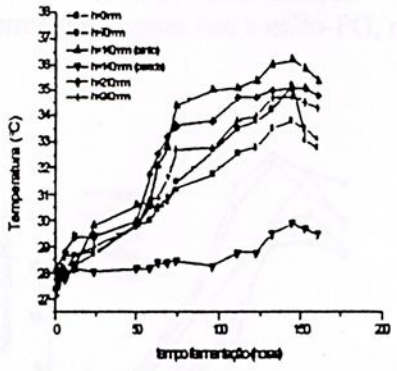


Figura IV. Perfis de temperatura das diversas alturas (h) do leito semi-sólido em função da densidade aparente do meio (d_{ap}=665g/L)

As maiores temperaturas em todos os meios de fermentação apresentaram-se na altura central (h=144 mm) do reator e as menores na parede onde mantiveram-se com pequenas alterações ao longo da fermentação. Nas alturas de 70 mm e 210 mm as temperaturas apresentaram-se menores comparadas com as temperaturas centrais, devido a transferência convectiva do calor da parte inferior da coluna pelo ar ascendente e no topo da coluna, onde o meio troca calor com a corrente de ar e ambiente. GOWTHAMAN et al. (1993) estudaram o gradiente de temperatura e concentração de gás em fermentação com reator de coluna (h = 345mm e d =150mm) e observaram que na altura de 33mm a temperatura do meio atingiu 35°C, nas alturas de 170mm e 280mm as temperaturas máximas foram de 45°C e 47°C, respectivamente. STUART et al. (1999) observaram aumento de temperatura ao longo da fermentação semi-sólida na produção de proteína em reator de coluna, onde a temperatura no meio com maior quantidade de substrato (3Kg) foi de 35,5°C e para 1,5Kg de substrato de 33,4°C.

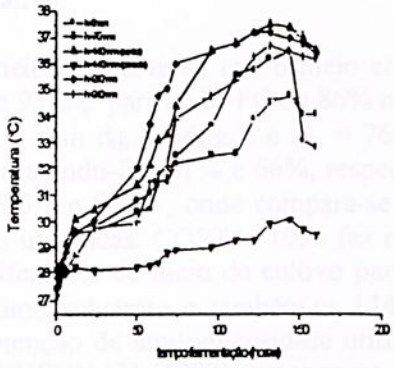


Figura V. Perfis de temperatura das diversas alturas (h) do leito semi-sólido em função da densidade aparente do meio (d_{ap}=760g/L)

As Figuras VI e VII mostram o efeito da densidade aparente do meio (d_{ap}) sobre a atividade enzimática de exo e endo-PG, ao longo do processo de fermentação do meio semi-sólido. Pode-se observar pelas figuras que o meio com densidade aparente menor (430 g/L) foi o que permitiu obter maiores valores de atividade enzimática, 264 U/g no sexto dia de fermentação e 738 U/g no quinto dia de fermentação para exo e endo-PG, respectivamente.

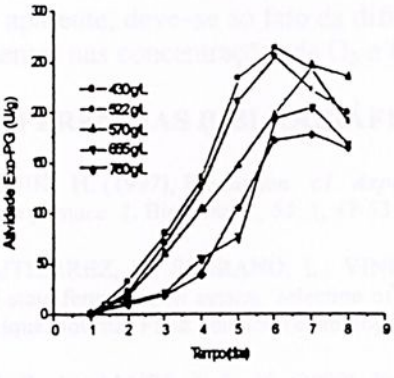


Figura VI. Efeito da densidade aparente do meio (d_{ap}) sobre a atividade de exo-PG ao longo do processo fermentativo.

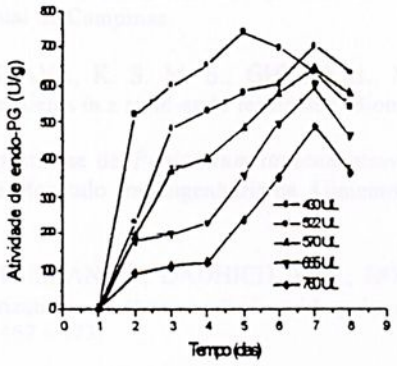


Figura VII. Efeito da densidade aparente do meio (d_{ap}) sobre a atividade de endo-PG ao longo do processo fermentativo.

Comparando os diversos meios observa-se que o meio com d_{ap} = 570 g/L permitiu obter valores de atividade de exo de 93% e para endo-PG de 86% maiores que as atividade do meio com menor d_{ap}. Para os meios com d_{ap} = 665g/L e d_{ap} = 760 g/L, foram obtidos atividades para exo-PG 77% e 67% e para endo-PG 81% e 66%, respectivamente. Tais valores podem ser observados nas Figuras 9.3.1 e 9.3.2 , onde compara-se as curvas de atividade para as diversas densidades aparentes utilizadas. COSTA, 1996 fez realizou ensaios em fermentador de coluna com densidades diferentes de meio de cultivo para produção de amiloglicosidase utilizando farelo de arroz como substrato e também-se 1342,3 U/g e para d_{ap} = 924 U/L obteve-se 1274 U/g. Para obtenção de amiloglicosidase utilizando como substrato farelo de trigo, PANDEY e RADHAKRISHNAN (1992) variaram as densidades aparentes dos meios fermentativos (320 a 400g/L) e obtiveram melhor atividade no meio com d_{ap} = 350 U/L.

CONCLUSÕES

Ao longo do processo de fermentação os valores de temperatura no centro do fermentador foram maiores nos ensaios com densidades aparentes maiores. A compactação do meio no interior da coluna afetou a aeração no interior desta, dificultado a remoção de calor fazendo aumentar a temperatura de maneira a prejudicar o crescimento do fungo utilizado.

O crescimento microbiano foi menor nos meios com densidades aparentes maiores e consequentemente menor a atividade enzimática. Essa diminuição de atividade enzimática com o aumento da densidade aparente, deve-se ao fato da difícil remoção do calor metabólico gerado e a formação de gradientes nas concentrações de O_2 e CO_2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEROVIC, M. & OSTROVERSNIK, H. (1997), Production of *Aspergillus niger* pectinolitic enzymes by solid-state bioprocessing of apple pomace. J. Biotechnol., 53, 1, 47-53.

BOCCAS, F.; ROUSSOS, S.; GUTIERREZ, M. SERRANO, L.; VINIEGRA, G. G. (1994), Production of Pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. Journal Food Science Technology. V. 31, p. 22-26.

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

COSTA, J.A.V. Estudo da produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 3122 em fermentação semi-sólida de farelo de arroz. (1996), Campinas. 202 p. Tese de doutorado em Engenharia de Alimentos. UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas.

GOWTHAMAM, M. K.; RAGHAVA, K. S. M. S.; GHILDYAL, N. P.; KARANTH, N. G. (1993), Gas concentration and temperature gradients in a solid-state fermentor. Biotechnology Advances, v. 11, p. 611-620.

HENNIES, P. T. Produção de pectinase de *Penicillium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido (1996), Campinas. 68 p. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos. UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. (2000), New developments in solid state fermentation: I bioprocess and products. Process Biochemistry. V. 35, p. 1153 – 1169.

RIZZATTO, M. L.; GOMES, E.; ALEGRE, R. M. (1999), Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de laranja industrializado. Campinas.

SOMOGY, M. (1952), Notes on sugar determination. Journal of Biologycal Chemistry, v. 195, p. 19.

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

CAPÍTULO III

PRODUÇÃO DE ENZIMAS DESPOLIMERIZANTES DE MATERIAL VEGETAL COM APLICAÇÃO INDUSTRIAL:

Microrganismos termofílicos e produção de enzimas termoestáveis

INTRODUÇÃO

1-Microrganismos termofílicos

Uma das mais surpreendentes propriedades dos microrganismos é sua habilidade de 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 seres vivos (LASA; BERENGUER, 1993).

Dentre todos esses fatores, a temperatura é que mais influencia o função das biomoléculas e a manutenção das estruturas biológicas. De fato, 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 (MANDIGAN et al., 2003):

a) *Termofílicos* que incluem organismos com faixa de crescimento entre um mínimo de 20ºC em um máximo de 55ºC, sendo as temperaturas ótimas entre 40º e 50ºC. Nesse grupo estão incluídos procariotos dos Domínios Bacteria e Archaea e do Domínio Eukarya (fungos filamentosos).

b) *Termofílicos extremos* que incluem microrganismos capazes de crescer em temperaturas entre 65° a 85°C. Esse grupo é representado pelos procariotos dos Domínios Bactéria e Archaea.

c) *Hipertermofílicos* entre os quais estão as Archaea com capacidade de crescer em temperaturas de 85° até 110°C.

Evidências sugerem que organismos hipertermofílicos foram as primeiras formas de vida na Terra e suas proteínas podem, portanto, servir como modelos para o entendimento da evolução das enzimas sob os pontos de vista biológico, químico e físico-químico (ARNOLD et al., 2001).

Embora não se conheça a temperatura máxima na qual a vida é possível, acredita-se que esta não atinja valores muito acima de 110°C, temperatura em que os aminoácidos e outros metabólitos e monômeros celulares são instáveis, embora o ATP entre em hidrólise espontânea somente a 140°C (STETTER, 1996; ADAMS, 1978).

Existem mais de 70 espécies, 29 gêneros e 10 ordens de hipertermofílicos, sendo a maioria do Domínio Archaea. Entre os organismos hipertermofílicos descritos, o *Pirococcus fumari* é o que consegue crescer em temperaturas mais elevadas, entre 90 e 113 °C (HUBER et al., 1986). No Domínio Bactérias destacam-se poucas espécies como *Aquiflex pyrophilus*, *Fervidobacterium pennavorans*, *Thermatoga marítima, Thermocrinis rubber*, *Aquiflex profundus* e *T. neapolitana* (VIELLY; ZEIKUS, 2001; HUBER et al., 1998; HUBER et al., 1992; HUSER et al., 1986).

Poucas espécies de Eucariotos conseguem crescer entre 45° e 55°C. Essa maior termolabilidade deve-se mais aos seus sistemas de membrana, do que à termoestabilidade das enzimas ou de outros compostos químicos celulares. O primeiro fungo termofílico isolado foi *Mucor pusillus*, há um século atrás. Em seguida, Hugo Miehe estudou a microflora de pilha de compostagem de resíduos agrícolas isolando outras espécies de fungos termofílicos. Cerca de 30 espécies de fungos somente, entre as 50.000 descritas, crescem em temperaturas entre 40°C e 45°C, embora existam algumas espécies com capacidade de crescer entre 60° e 62°C (MOUCHACCA, 1997).

Na natureza, em ambiente mesofílico, os organismos termofílicos se desenvolvem em processos de compostagem durante a fase de alta temperatura (acima de 40°C), sucedendo a microflora mesofílica. Estudos comparando o aumento da temperatura de material sólido inoculado com culturas mesofílicas e termofílicas demonstraram que a temperatura máxima de aquecimento do meio depende da temperatura máxima de crescimento da linhagem e que esse fenômeno é fator seletivo para organismos termofílicos (MAHESHWARI et al., 2000; MOUCHACCA, 1997).

Num processo de compostagem, pode-se distinguir três fases: na primeira fase, a microbiota mesofílica cresce aceleradamente, assimilando, preferencialmente, as fontes de carbono prontamente assimiláveis e solúveis (açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos) ou polímeros de mais fácil acesso gerando calor através das reações metabólicas exotérmicas e elevando a temperatura para aproximadamente 40°C. Esse aumento de temperatura inibe o crescimento dos mesofílicos e estimula a germinação dos esporos dos

fungos e bactérias 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, embora as atividades das bactérias extremofílicas e hipertermofílicas sejam continuadas (MAHESHWARI et al., 2000).

Pelo exposto, espera-se que fungos e bactérias termofílicos sejam potenciais produtores de enzimas despolimerizantes. Entretanto, alguns fungos termofílicos como *Thermomyces lanuginosus*, *Talaromyces duponte* e *Mucor (Rhizomucor) pusillus* não conseguem utilizar a celulose como fonte de carbono. Porém, a incapacidade de hidrolisar um 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 assim como, fungos pectinolíticos termofílicos nem sempre são bons produtores de enzimas hemicelulolíticas. Por outro lado, os organismos que não despolimerizam a matéria orgânica podem crescer comensalmente utilizando açúcares liberados por outros organismos que o fazem (SINGH et al, 2000).

2-Adaptação dos microrganismos à termofília

A adaptação de um determinado microrganismo à termofilia envolve aspectos cruciais como adaptação da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA às temperaturas acima da faixa mesofílica.

A adaptação das membranas em termofílicos corresponde a um processo chamado *homeoviscoso*, o qual consiste na substituição de ácidos graxos insaturados por ácidos graxos saturados, de modo que a membrana adquira um equilíbrio entre densidade e fluidez, necessário para a manutenção

de sua integridade física e funcional em temperaturas elevadas. Essa adaptação ocorre nos Domínios Bacteria e Eukaya (Reino Fungi) (ADMAS, 1993).

No Domínio Archeae, as membranas apresentam lipídeos formados por ligação éter entre o glicerol e um hidrocarboneto (cadeias hidrofóbicas longas formadas por repetidas unidades do composto contendo cinco carbonos isopreno). Os lipídeos mais comuns de Archeae são o glicerol diéter e o diglicerol tetraéter de fitanil (C_{20}) e bifitanil (C_{40}). Além disso, a estrutura geral dessas membranas corresponde a uma monocamada lipídica em contraste com o modelo de bicamada formada por ácidos graxos e glicerol das membranas biológicas convencionais. Essa estrutura diferenciada possibilita a estabilização da membrana citoplasmática em temperaturas em torno de 100°C (JAENIKE; BÖHM, 1998; TOLNER et al., 1997; DE ROSA et al., 1994; JAENIKE, 1991).

A manutenção da estrutura do DNA sem dúvida é um fator imprescindível para a estabilidade de organismos termofílicos, principalmente, de hipertermofílicos. No citoplasma desses últimos, tem sido detectada grande quantidade de 2,3-difosfoglicerato cíclico de potássio, cuja função é impedir danos químicos na molécula de DNA, como a despurinação que pode ocorrer em altas temperaturas. Ainda, todos os hipertermofílicos produzem uma única forma diferenciada de DNA topoisomerase chamada DNA Girase Reversa a qual introduz superenovelamentos positivos no DNA, em contraste com os superenovelamentos negativos gerados pela DNA Girase convencional (LOPEZ, 1999). O superenovelamento positivo promove maior resistência do DNA à desnaturação térmica.

Outras proteínas também aparecem relacionadas à termoestabilidade do DNA, como por ex., uma pequena proteína termoestável chamada Sac7d, encontrada em *Sulfolobus,* que se liga ao sulco menor do DNA aumentando sua temperatura de desnaturação em cerca de 40°C. Semelhante à Sac7d, existem também as proteínas fortemente básicas, com seqüência homóloga às histonas de Eukaya, chamada "histonas de Archeae" que compactam o DNA em estruturas semelhantes a nucleossomos mantendo-o em dupla fita mesmo em temperaturas elevadas (MADIGAN et al., 2003, THOMAS ; CAVIOCHIOLI,

1998).

Dentre os fatores que afetam a estabilidade e cinética das proteínas (pH, detergentes, agentes caotrópicos e calor) o calor é que mais requer formas de adaptação dentro do contexto biológico.

Termoestabilidade de uma enzima refere-se à termoestabilidade dinâmica e cinética. A termoestabilidade termodinâmica (T_m) representa 50% da enzima desdobrada e a termoestabilidade cinética, reflete a meia vida ($T_{½}$) da enzima, a uma determinada temperatura. Essa termoestabilidade está diretamente associada ao dobramento da proteína, o qual é estabilizado por equilíbrio entre forças de dobramento e de desdobramento (energia de estabilização da enzima ΔG_{stab}) que é representado por (VIEILLE et al., 1996):

$\Delta G_{stab} = \Delta H_{stab} - \Delta S_{stab}$, onde ΔH = entalpia de estabilização (dobrado) e ΔS = entropia (desdobrado)

Enzimas estáveis a elevadas temperaturas são chamadas termozimas, contra terminologia equivalente mesozima, para as mais sensíveis.

A conformação funcional para termozima e mesozima é a mesma conforme mostrado pela curva Anhenius linear, sugerindo que as mesmas permanecem inalteradas apesar da diferença de temperatura de atuação de ambas. Entretanto, deve ser destacado que algumas enzimas de hipertermofílicos apresentam curva de Anhenius atípica, com bifase, indicando mudança conformacional significativa (DANIEL, 1996).

A proteína nativa é mantida por um delicado balanço de forças não covalentes, como pontes de H, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e força de Van der Waals. Com o aumento da temperatura, essas interações são rompidas e a proteína se desdobra. O grau de desdobramento de uma proteína pode ser observado por colorimetria, fluorescência, espectroscopia de discroismo circular, viscosidade e migração. Algumas proteínas recuperam sua conformação ativa após o resfriamento, porém, para a maioria, a desnaturação é irreversível. As proteínas desenroladas formam estruturas dispersadas que podem agregar-se. Essa a agregação ocorre quando resíduos hidrofóbicos, que normalmente ficam no interior da molécula nativa e que tornaram-se expostos ao solvente, em conseqüência do desenrolamento, interagem com

outros resíduos hidrofóbicos de outras cadeias desenroladas. Esses agregados precipitam, caracterizando a enzima desnaturada (VOET et al., 2002; TOMAZIC; LIBANOV, 1988).

Outro fator de desnaturação da proteína é a desamidação da Asparagina (Asn) e da Glutamina (Gln). Proteínas desenroladas tornam-se muito mais susceptíveis à desamidação do que a nativa, pois os resíduos mais susceptíveis são expostos. No mecanismo ácido base geral, o ácido geral (HA) protona o grupo (—NH) da Asn. A base geral (A^- ou OH^-) ataca o carbono do grupo carbonila do grupo amida ou ativa um outro grupo nucleofílico. O estado de transição é, supostamente, um intermediário oxi-anion tetraédrico. A ordem com que o ácido ou a base atacam depende do pH (DEMIRJIAN et al., 2001).

Outro fator de desnaturação da proteína é a hidrólise de ligações peptídicas, a qual ocorre mais freqüentemente no C-terminal lateral do ácido Aspártico, em ligações entre Asp→Pro a qual tem se mostrado ser a mais lábil das ligações peptídicas. Essa ligação é mais lábil porque o N da Pro é mais básico do que o de outros resíduos e o Asp tem uma propensão aumentada para a β-isomerização quando ligadas ao N da Prolina. Também pode ocorrer clivagem entre as ligações Asn→Xaa por um mecanismo semelhante no β-aspartil. Nessa reação, o grupo amino do Asp atua como nucleófilo, atacando seu próprio carbono carboxila da cadeia principal. A temperatura que favorece o desenrolamento também aumenta a propensão à quebra das ligações peptídicas (SCANDURRA et al.,1998).

A β-eliminação de pontes dissulfeto também é fator de desnaturação de proteínas, sendo mais susceptíveis aquelas com alto teor de aminoácidos enxofrados. A reação de β-eliminação consiste na destruição das pontes S—S em condições alcalinas, produzindo dihidroalanina e tiocisteína. A primeira reage como grupo nucleofílico, principalmente grupo amino da Ala e forma lisinoalanina. A ação da segunda não é ainda bem entendida. A β-eliminação produz tióis livres que podem catalisar permutas de pontes de S—S e desnaturar a proteína (VIELLE; ZEIKUS, 2001).

A oxidação da cisteína, geralmente catalisada por cátions, principalmente Cu^{+2}, leva à formação de pontes S—S intra e inter molecular. A Cys também pode desencadear trocas de S—S levando à variação estrutural,

como por ex, pontes S—S inter-unidades (KUMAR ; NUSSINOV, 2001).

A exposição de resíduos, decorrente do desenrolamento da molécula de proteína, também pode acelerar outras reações envolvendo outros resíduos de aminoácidos, como oxidação da metionina ao seu sulfóxido, racenização de resíduos Asp, mudança da Ser para sua forma D, reação da Lys com açúcar redutor (reação de Maillard), autólise de proteases decorrentes de alterações das dobras da estrutura secundária (VOET et al.,2002).

A adaptação a ambientes com temperatura acima da mesofílica, na maioria dos casos, não requereu nova maquinaria molecular, visto que os termofílicos possuem moléculas muito semelhantes às dos mesofílicos. Entretanto, algumas diferenças na seqüência, estrutura, função, propriedades dinâmicas e termodinâmicas podem ser observadas entre enzimas de psicrofílicos, mesofílicos e termofílicos (NIEHAUS et al., 1999).

As diferenças observadas nas seqüências das proteínas nem sempre podem ser relacionadas com termoestabilidade, haja visto, que uma combinação de fatores de pressão seletiva atuaram sobre as proteínas por milhões de anos (pressão, pH, temperatura), além das mutações silenciosas que se acumularam. Dessa forma, para elucidar o mecanismo adaptativo é importante distinguir o comportamento da enzima que é ditado pela biologia, daquele que é ditado pela físico-química (termoestabilidade e propriedades catalíticas). Durante o curso da evolução, as enzimas foram ajustando suas interações estabilizadoras de modo a otimizar o balanço entre rigidez (para a estabilidade) e flexibilidade (para atividade) (ARNOLD et al., 2001).

Para que uma proteína de psicrofílico tenha eficiência catalítica, a 10°C, comparável a dos mesofílicos, deve exibir, nessa temperatura, movimento térmico da mesma maneira que a mesofílica, a 37°C. Quando essa enzima de psicrofílico é exposta a 37°C, o movimento térmico torna-se tão acelerado que pode levar à perda de sua estrutura nativa (desdobramento). Ao contrário, quando a mesozima é resfriada a 10°C sua flutuação térmica é reduzida, diminui a mobilidade conformacional de seu sítio catalítico e, conseqüentemente, a eficiência de catálise (FÁGÁIN, 1995).

Inúmeros trabalhos têm evidenciado que a adaptação das proteínas à termofilia está relacionada, principalmente, com o aumento da rigidez da

unesp

molécula (KARSHOKOFF; LADENSTEIN, 1998; FÁGÁIN, 1995), embora as enzimas excepcionalmente flexíveis tenham sido isoladas de Archaeas hipertermofílicas (GRAZIANO et al., 1995).

A elevada rigidez intrínseca da proteína termofílica em temperaturas mesofílicas (<40°C) deve-se ao aumento da entropia de dobramento que é resultante da interação de várias forças. Essa rigidez leva ao requerimento de alta temperatura de atividade para a promoção do movimento térmico e o aumento da flexibilidade essencial para a atividade catalítica, ou seja, a adaptação da proteína às temperaturas extremas parece ser o resultado de um equilíbrio entre aumento da rigidez responsável pela estabilidade térmica e a flexibilidade requerida para exercer sua função fisiológica (SHIRAKI et al., 2001).

Duas estratégias evolutivas parecem definir a termoestabilidade: fatores intrínsecos ou diretamente associados à estrutura da molécula, levando a rigidez e ao dobramento e fatores extrínsecos, que ajudam a estabilizar as proteínas num determinado meio, como solutos, ligantes, chaperonas moleculares e o próprio substrato (BRUINS et al., 2001).

Visto o consenso de que a rigidez e o dobramento são as causas da termoestablidade, é necessária a compreensão dos fatores que contribuem para que essa rigidez ocorra.

O chamado "efeito hidrofóbico" é o principal mecanismo de termoestabilidade intrínseca da proteína e direciona o dobramento que resulta na estrutura nativa da molécula e diminui sua tendência de se desdobrar. Essa conclusão, segundo Scandurra et al. (1998), foi baseada nas seguintes observações: a) Solventes polares não desnaturam proteínas termoestáveis; b) resíduos hidrofóbicos são "seqüestrados" para o interior da molécula, evitando o contato com a água; c) resíduos hidrofóbicos das proteínas termoestáveis são mais conservados do que os hidrofílicos.

Embora as proteínas de mesofílicos tenham uma estabilidade básica dada pelo "core" hidrofóbico, que é a região mais conservada da molécula, a diferença entre estas e as termozimas é que essa hidrofobicidade, nessas últimas, aparece também nas regiões menos conservadas. As proteínas termoestáveis tendem a apresentar núcleos altamente hidrofóbicos.

unesp

O efeito hidrofóbico faz com que as substâncias apolares minimizem seus contatos com a água. A agregação das cadeias apolares dos aminoácidos no interior que uma proteína favorece o aumento da entropia de dobramento da molécula, pois evitam a formação de "gaiolas" ordenadas de moléculas de água em torno dos grupos hidrofóbicos. Quanto maior a hidropatia (tendências hidrofóbicas e hidrofílicas combinadas de cada aminoácido) maior a tendência do aminoácido ocupar o interior da proteína. Os aminoácidos mais hidrofóbicos são: Isoleucina, Valina, Leucina, Fenilalanina, Cisteína e Metionina. A Arginina é o aminoácido mais hidrofílico. As termozimas têm, portanto, alto teor de aminoácidos hidrofóbicos e com resíduos aromáticos (VOET et al., 2002).

Além do efeito hidrofóbico, o dobramento da proteína termoestável pode ser mais estável a elevadas temperaturas por modificações na composição de aminoácidos da seqüência primária da molécula e outros fatores os quais estabilizam a estrutura secundária (α-hélice), os quais são descritos a seguir:

Com relação à composição de aminoácidos da seqüência primária, destacam-se:

a- Substituição da Glicina: A Glicina, na molécula de proteína, é o resíduo que tem a maior entropia conformacional. No processo de dobramento, requer mais energia para restringir a sua configuração. Por outro lado, a Alanina é o resíduo melhor formador de hélice. Portanto, maior proporção de Ala e menor proporção de Gly permitem maior estabilidade da hélice (VIENEN et al., 1987).

b- Aumento do teor de Prolina: Esse aminoácido, com seu anel pirolidínico, consegue adotar apenas poucas configurações e diminui e entropia de desenrolamento, estabilizando a proteína. Portanto, altos teores de Prolina aumentam a termoestabilidade (KULAKOVA et al., 2004; SUZUKI et al., 1991).

c- Redução de resíduos β-ramificados: Resíduos de Valina, Isoleucina e Tirosina não são muito tolerantes à hélice em função das ramificações do C β. Destaque-se, no entanto, que a Ile e Val são aminoácidos com altas hidropatias e aparecem com alta freqüência nos núcleos hidrofóbicos das termozimas (VIELLE ; ZEIKUS, 2001).

d- *Redução de resíduos polares não carregados e aumento dos resíduos carregados*. Resíduos carregados estabelecem pontes de sais na

superfície da molécula aumentando a termoestabilidade (ELCOCK, 1998)

e-*Substituição da Lisina por Arginina*: Entre os aminoácidos carregados positivamente, a Arginina é melhor adaptada a termofilia visto que o grupo guanidina tem uma reatividade química reduzida devido ao seu alto pKa e sua ressonância. O grupo guanidina promove maior área de superfície para interações entre cargas (interações não covalentes) do que o grupo amino da Lys. Por ter cadeia lateral com menor quantidade de grupos metileno do que a Lys, a Arg tem um potencial menor para de desenvolvimento de contato desfavorável o solvente. A menor relação Arg/Lys nas proteínas termoestáveis pode indicar que o aumento da Arg seria um mecanismo de adaptação à termofilia. Porém essa não é um padrão para todas as termozimas (MRABET et al., 1992).

f-*Redução de Asparagina*: Esse aminoácido é mais susceptível à reação de desamidação decorrente da exposição do resíduo no desdobramento térmico. Quando a enzima termoestável apresenta alto teor desse resíduo, o mesmo encontra-se em localização e em conformação não susceptíveis à desamidação (DANIEL et al., 1996).

g-*Posicionamento da Cisteína em termofílicos aeróbicos*: Esse resíduo é susceptível à oxidação quando exposto a solvente em condições oxidativas. Por outro lado, exerce função importante na estabilização da estrutura da proteína, através das pontes S—S. Em função disso, em termofílicos aeróbios, a Cys aparece envolvida em interações estabilizadas específicas (pontes S—S ou ligada a metal) e/ou são inacessíveis ao solvente (MATSUMURA et al, 1989).

As estruturas secundárias de proteínas termoestáveis são estabilizadas pelos mesmos mecanismos das mesofílicas. Entretanto, apresentam algumas características específicas relacionadas, como:

a-Pontes dissulfeto: As pontes dissulfeto estabilizam a proteína por reduzirem a entropia do estado desenrolado da proteína. Em função da susceptibilidade à oxidação da Cisteína, a 100°C, como mencionado anteriormente, supõe-se que esta seja a temperatura limite da termoresistência decorrente de estabilização por S—S. Por outro lado, as enzimas de hipertermofílicos, que atuam em temperaturas acima de 100°C, podem ter

S—S em regiões inacessíveis ao solvente (GRAZIANO et al., 1995)

b-*Pontes de hidrogênio*: Na α-hélice, as pontes de H da cadeia principal estão arranjadas de forma que a ligação peptídica C=O do enésimo resíduo aponta, ao longo do eixo da hélice, na direção do grupo peptídico N—H do resíduo (*n* + 4). Isso resulta em pontes de H fortes que têm distância N---O quase ideal de 2,8°A (doador H e aceptor H). Foi demonstrada uma forte correlação entre termoestabilidade e o número de ligações H neutro carregadas, por ex, um átomo da cadeia lateral de um resíduo carregado e outro átomo de cadeia principal ou lateral de resíduo neutro, visto que esse tipo de ligação é termodinamicamente mais estável (FÁGÁIN, 1995).

c-*Pareamento de íons*: Esses pareamentos aparecem em pequenos números na proteína, não são conservados e não direcionam o dobramento da molécula. Entretanto, alguns autores sugerem que a interação eletrostática é importante para a termoestabilidade. O pareamento de íons forma uma rede que cruza a superfície da proteína e as interfaces das subunidades. Enzimas estabilizadas por interações iônicas, como a metil-aminopeptidase de *P. furiosus* apresentam redução da estabilidade em pH ácido, quando os resíduos acídicos estão protonados e desfavorece a ligação iônica. Também sofre a ação de altas concentrações de sal, que desestabilizam o pareamento iônico. A Arginina forma, além de pontes de H, pareamento de íons com grupos carboxílicos (MOZHAEV, 1992).

d-*Encurtamento do N e C terminais e ancoramento da terminação livre*: Os "loops" de termozima são encurtados e/ou melhor ancorados do que o resto da proteína. O ancoramento do "loop" é feito por pareamento de íons, pontes de H ou por interações hidrofóbicas. A estabilização do C e N terminais envolve mecanismos semelhantes aos do "loop" (SHMIDT-DANNERT; ARNOLD, 1999).

e-*Estabilização por ligação com metal*: Os metais são conhecidos há longo tempo como capazes de estabilizar proteínas. As xiloses isomerases estão ligadas a dois íons metálicos (Co^{+2}, Mg^{+2} ou Mn^{+2}). Um cátion está diretamente envolvido na catálise e outro na estrutura principal. Os dois metais ligantes têm, portanto, diferentes especificidades e suas exclusões afetam a atividade enzimática, especificidade pelo substrato e termoestabilidade. As α-

amilases termofílicas ligam-se ao Ca^{++}. O sítio catalítico dessa enzima está localizado em uma fenda entre dois domínios (um barril α/β e um grande "loop"). Coordenado por ligantes entre esses domínios, o Ca^{++} é essencial para a atividade catalítica e termoestabilidade. Algumas termozimas possuem metais que não estão presentes em sua homóloga mesofílica, como fenoxidina de *Sulfolobus sp* que contém Zn^{+2} e serina protease de *Thermoactinomyces vulgaris*, que contém Ca^{++}, sugerindo que a aquisição do metal foi fator de adaptação a termoestabilidade (BISMUTO et al, 2004; STETTER, 1999).

f-*Modificação pós-tradução:*A glicosilação das proteínas é fator importante na termoestabilidade. Muitas termozimas de eucariotos e procariotos são glicosiladas, embora poucos exemplos em hipertermofílicos tenham sido descritos. A glicosilação aumenta a termoestabilidade sem afetar as dobras e conformação da proteína (WANG et al., 1996).

Entre os fatores extrínsecos de termoestabilização, destacam-se os solutos, proteínas ligantes, Chaperonas moleculares (chaperoninas), sais, coenzimas, ativadores, poliaminas e o próprio substrato. Esse tipo de estabilização é mais comum para enzimas intracelulares (MUKHOPADHYYAY et al., 2003).

Os sais inorgânicos ajudam na estabilidade da enzima por exercerem efeito específico quando o íon do sal interage com a proteína na maneira conformacional, e através de um efeito geral do sal, o qual afeta, principalmente, a atividade de água. Algumas termozimas de metanogênicos são estabilizado por K^{+1}, NH^{+1}_4, SO^{-2}_4 e HPO^{-2}_4 (SHIMA et al., 2004; ELCOK, 1998). Enzimas citoplasmáticas estabilizadas por sal, requerem um ambiente celular com elevadas concentrações dos mesmos. Essas enzimas apresentam ainda duas características importantes: redução da hidrofobicidade da superfície e das interfaces das subunidades e superfície do tetrâmero (estrutura quaternária) com resíduos com carga negativa (HAKI ; RAKSHIT, 2003).

Certos solutos como di-inositol fosfato, diglicerol fostato, e monosilglicerato são produzidos em quantidades significativas em termofílicos e estabilizam proteínas citoplasmásticas contra desnaturação térmica (MANDIGAM et al., 2003).

Tem sido descrita ainda, a estabilização das enzimas pelo próprio substrato e pelo aumento da pressão. O aumento da pressão tende a reduzir o volume da proteína estabilizada por interações hidrofóbicas (ADAMS, 1993).

Outro fator de estabilização são as chaperoninas. Por algum tempo confundidas com proteínas de choque térmico (Hsp), as chaperoninas são chaperonas moleculares que têm como função, a restauração de proteínas parcialmente desnaturadas pelo calor. É bem conhecido que as chaperonas moleculares são proteínas intracelulares que direcionam o dobramento das proteínas ligando-se às proteínas não-dobradas ou às cadeias polipeptídicas parcialmente dobradas para evitar associações impróprias do segmento hidrofóbico expostos, os quais poderiam levar a um arranjo não nativo, resultando em agregado de peptídeo e precipitação. As chaperonas permitem ainda, que proteínas dobradas de maneira imprópria sejam reorganizadas em sua conformação nativa (LEUSCHNER; ANTRANIKIAN, 1995). Essas proteínas são ubíquas, encontradas em procariotos, eucariotos, plantas e mamíferos e podem ser expressadas sob estresse decorrente do aumento de temperatura, permitindo uma adaptação para a preservação de suas enzimas essenciais.

Existem duas classes de chaperonas em procariotos e eucariotos, as Hsp 70 (70 KD) e as Chaperoninas (grandes subunidades). Em *Escherichia coli* foram descritas dois tipos de chaperoninas, a Hsp 60 (Gro EL) e a Hsp 10 (Gro ES). Estas formam o complexo Gro EL–Gro ES. A GAO-EL é um cilindro cuja abertura terminal é fechada pelo GRO-ES. O interior do cilindro proporciona a formação de ambiente protegido em que a proteína pode dobrar-se sem agregar-se com outras parcialmente dobradas (VOET et al., 2002).

O interior do cilindro de Gro-EL contém porções hidrofóbicas que ligam-se, ainda, aos grupos expostos de proteínas impropriamente dobradas. Nessa situação, o ATP liga-se ao Gro EL que, ao ser quebrado (ADP + P), promove mudança conformacional que "esconde" as porções hidrofóbicas. A proteína é então liberada para continuar seu dobramento. A ligação e liberação descritas levam as proteínas parcialmente dobradas de aprisionarem-se em locais de energia mínima, permitindo que a proteína em processo de dobramento vá se afunilando até adquirir a forma nativa. Esse ciclo de ligação e redobramento

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

(impelido pelo ATP) repete-se até que a proteína alcance sua conformação nativa (ELLIS, 1987)

Em *Pyrodictium,* uma Archea hipertermofílica, a principal chaperonina chama-se termossomo, que atua mantendo as demais proteínas apropriadamente dobradas e funcionais, mesmo nas elevadas temperaturas de crescimento do organismo (em torno de 110°C) (MANDIGAM et al., 2003).

3– Produção de enzimas termoestáveis de importância industrial por microrganimos termofílicos

As enzimas termoestáveis, de uma maneira geral, apresentam vantagens para a aplicação na indústria visto que processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas, têm o risco de contaminação por microrganismos mesofílicos, que são a maioria num ambiente industrial, significativamente reduzido. Por outro lado, as temperaturas mais elevadas favorecem a solubilidade de substratos e produtos, e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos. Ainda, as enzimas extracelulares constituem importante modelo para entendimento dos mecanismos de termoestabilidade e termo-atividade, os quais são usados nos processos de engenharia de proteínas (ADAMS, 1978).

3.1- Amilases termoestáveis

A maioria dos processamentos industriais do amido envolve a hidrólise desse polímero. Os chamados "hidrolisados de amido" englobam todos os produtos resultantes do fracionamento do amido, independentemente do catalisador ou do grau de fracionamento. São incluídos nesta denominação, diferentes tipos de produtos como xaropes de glicose, maltose, frutose, maltotetrose, dextrinas e ciclodextrinas (TEAGUE; BRUMM, 1992). A composição de um hidrolisado que se deseja obter é definida em função do direcionamento da aplicação do mesmo. Cada tipo de xarope requer, portanto, diferentes combinações de enzimas amilolíticas.

Durante muito tempo, o amido foi hidrolisado químicamente, por ação de ácidos. Esse processo, no entanto, gerava subprodutos indesejáveis como

compostos coloridos ou de "flavor", além de dificultar o controle dos teores dos produtos finais. Nos últimos 30 anos, as amilases substituíram o tratamento ácido.

O processamento enzimático do amido ocorre em altas temperaturas e envolve dois passos importantes, a liquefação e a sacarificação. Durante a liquefação, os grânulos do amido são gelatinizados em solução aquosa (35% em peso seco, pH 5,9-6,5), a 105-110°C, por 5 minutos e então, essa solução é tratada com α-amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* e de *B. stearothermophilus*, a 95°C, por 2 a 3h. Essa enzima hidrolisa parcialmente as ligações α-1,4, liberando maltodextrinas, com redução acentuada da viscosidade. Após a liquefação, o pH é ajustado a 4,2-5,0 e a temperatura baixada para 55-60°C seguindo-se a etapa de sacarificação. Durante a sacarificação (24-72h), o amido liquefeito é convertido em sacarídeos de baixo peso molecular e, finalmente, em glicose e maltose. Xaropes contendo 95-96% de glicose são produzidos usando, nessa segunda etapa, uma mistura de pululanase e glucoamilase de *Aspergillus niger* ou de *A. orizae*, enquanto que xaropes com 80-85% de maltose são produzidos usando pululanases e β-amilase de *B.polymyxa* (NIGAM; SINGH, 1995).

As condições de pH e temperatura, para as fases de liquefação e sacarificação, foram definidas de modo a evitar subprodutos indesejáveis, e, principalmente, levando em consideração condições ótimas de atividade e de estabilidade das enzimas. A etapa crítica do processo é a de sacarificação, a qual usa enzimas de mesofílicos e, portanto, com menor termoestabilidade, requerendo o resfriamento do material e controle para que a temperatura não ultrapasse 60°C. Enzimas sacarificantes mais termoestáveis são desejáveis nesse processo, pois evitariam o passo de resfriamento e, conseqüentemente, levariam à redução de custos. Dessa forma, pesquisa com termofílicos, buscando a produção de glucoamilases e pululanases mais termoestáveis são necessárias (NIEHAUS et al, 1999; ADAMS, 1994).

Glucoamilases de bactérias termofílicas como *Clostridium thermosulfuricum* e *C. thermosacarolyticum*, que apresentam atividade ótima a 70°C por 7horas foram descritas, além de pululanases de *Bacillus flavocaldarius* que são otimamente ativas entre 75-85°C (LEGIN et al, 1997;

SPECKA et al, 1991; IHYUN; ZEIKUS, 1985).

A busca por enzimas amilolíticas, com atividade a temperaturas ainda mais elevadas, entre organismos procariotos, fez com que, nas últimas décadas, houvesse muita pesquisa sobre a produção amilases pelos hipertermofílicos. *Thermococcus agregans e Pirococccus furiosus,* produzem pululanases que atuam a 100 e 105°C, respectivamente (BRAGER et al, 1989), *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* produz uma glucoamilase que atua entre 70-75ºC e *Thermatoga maritima*, uma β-amilase com atividade ótima a 90°C (SCHUMANN et al., 1991). Entretanto, está entre as α-amilases as maiores temperaturas de atuação enzimática encontradas, como as de *Thermococcus profundus*, *Pyrococcus woesi* e *P. furiosus*, cujas atividades máximas ocorrem a 80°C, 100°C e 100°C, respectivamente (CHUNG et al., 1995; BROWN et al., 1991). A α-amilase produzida por *P. furiosus*, apresentou-se cataliticamente ativa a 140°C, com meia vida a 120°C por duas horas (KOCH et al, 1991).

O uso direto dos organismos hipertermofílicos para produção das enzimas tem se mostrado inviável em função das dificuldades de cultivos dos mesmos e pela baixa expressão dos genes envolvidos. A alternativa que se busca é a expressão desses genes em organismos mais adaptados a processos fermentativos industriais como a *Escherichia coli* ou leveduras (GRZYBOWSKA et al., 2004; VIELLE ; ZEIKUS, 2001)

Os fungos, embora sejam organismos eucarioticos e, portanto, com termofilia moderada, são também bons produtores de amilases termoestáveis. Um fato interessante, é que, mesmo entre os mesofílicos, que crescem entre 28 e 32°C, pode-se encontrar enzimas que atuam em temperaturas até 30°C acima da temperatura máxima de crescimento do organismo produtor, como a glucoamilase de *Neosartorya fischeri*, que atua a 60°C (HANG, WOODAMS, 1993), glucoamilase de *Aspergillus fumigatus*, com atuação a 60°C (SILVA , PERALTA, 1998), amilase de *Mucor* sp, que glucoamilase de *Monoascus* sp KB9, que atua a 65°C (YONGSMITH et al, 2000), O fungo termofílico mais estudado como produtor de enzimas extracelulares, o *Thermoascus aurantiacus*, teve sua produção de amilase descrita em 1970, por Jayachandran, Ramabadran. A partir daí, vários outros fungos termofílicos têm

sido estudados: *Mucor pusillus*, que produziu α-amilase com atividade a 70°C (SOMKUTI, STEINBERTG, 1980), *Scytalidium thermophilum*, com uma glucoamilase e uma α-amilase com ação a 65°C (AQUINO et al., 2003; CEREIA et al., 2000) e *Streptosporangium* sp e *Talaromyces emersoni*, cujas glucoamilases atuam a 70°C (STAMFORD et al, 2002; NIELSEN et al., 2002).

O fungo *Humicola lanuginosa*, hoje identificado como *Thermomyces lanuginosus* (MAHESHWARI et al., 2001) é um excelente produtor de glucoamilase a qual apresenta estabilidade a 60°C (CAMPOS , FÉLIX, 1995; TAYLOR et al., 1978) e de α-amilase, também termoestável (ARNESEN et al., 1998), enquanto *T. aurantiacus* produziu α-amilase ativa a 65°C (JAYACHANDRAN; RAMADRAN, 1970).

Linhagens de *Thermomyces lanuginosus* ATCC 28083, ATCC 34626 e ATTC 44008 produziram α-amilase e glucoamilase com atuação a 70°C (RONASZÉKI et al., 2000). A α-amilase produzida pela linhagem *T. lanuginosus* ATCC 34626 apresentou meia vida a 60°C por um dia (NGUYEN et al., 2002).

Observa-se que não existe diferença muito pronunciada entre as termoestabilidades e temperaturas de atividade ótima das amilases produzidas por fungos termofílicos e alguns mesofílicos. Essa questão é muito interessante e requer estudos de sequenciamento das proteínas similares purificadas a partir dos dois grupos.

Outros tipos de enzimas amilolíticas, como a Ciclomaltodextrina gluconosiltranferase (CGTase), que converte oligodextrinas em ciclodextrinas, a α-glucosidase, que libera glicose a partir de dextrinas curtas e a pululanase, que atua sobre o pululano, também apresentam formas termoestáveies (SAHA ; ZEIKUS, 1991; SAHA ; ZEIKUS, 1989). Espécies do gênero *Themococcus* produzem CGTases com atuação a 90 e 100°C, e estabilidade a 105°C (TACHIBANA et al., 1999)

3.2- Pectinases termoestáveis

Uso de temperaturas elevadas durante o processamento de suco e outros produtos vegetais são etapas importantes dos processos industriais e

têm diversas finalidades.

Na maceração da uva para extração de suco, a incubação a 60-65°C promove a plasmólise da membrana e rupturas na parede celular facilitando a liberação do líquido e de antocianinas responsáveis pela cor dos sucos. Na extração de sucos de uva para a produção de vinhos, a fruta macerada é tratada a 80 °C para, além de facilitar a maceração, desnaturar oxidases que causam perda da cor do vinho durante a estocagem. Na extração do "pulp wash", a polpa da laranja (mistura de polpa e semente), resultante do peneiramento do suco de primeira, é aquecida a 90°C para desnaturar a pectina esterase da fruta que causa problemas de coagulação da pectina. Além das funções citadas, o tratamento térmico ainda tem por finalidade, a pasteurização dos sucos e mostos, visando a redução da microbiota contaminante, principalmente de leveduras. Em todos esses processos citados, o material submetido ao aquecimento precisa ser posteriormente resfriado a 50°C para o tratamento com pectinases comerciais, as quais são termolábeis (LEA, 1998). O uso de pectinases termoestáveis evitaria a etapa de resfriamento, reduzindo tempo e custo dos processos.

Pectinases termoestáveis seriam muito úteis também na degradação de pectina de resíduos de indústria de processamento de material vegetal, reduzindo a DBO e DQO dos mesmos e no processamento e degomagem de fibras têxteis, nos quais a temperatura mais elevadas reduziriam os contaminantes mesofílicos (KAPOOR et al., 2000).

Ainda, a extração de açúcar de beterraba, responsável por 29% da produção mundial de açúcar, requer a despectinização para aumento do rendimento, visto que mais de 30% do peso seco da beterraba corresponde à pectina. Industrialmente, essa extração é feita a temperaturas de aproximadamente 70°C e, dessa forma, uma despectinização simultânea à extração, usando pectinase termoestável, seria economicamente interessante (SINGH et al., 1999).

Uma vez que a pectina é um importante constituinte da parede celular vegetal, espera-se que essa enzima seja também comum entre os termofílicos decompositores de polímeros vegetais. Exemplos de pectinases bacterianas termoestáveis constam da literatura, como as poligalacturonases alcalinas de

Bacillus sp MG-cp-2, *Bacillus* sp DT7 e de *Bacillus* sp KSM-P7 (KASHYAP et al., 2003; KAPOOR et al., 2000; KOBAYASHI et al., 1999); a pectato liase de *Thermoareobacter italicus* sp.nov (KOZIANOWSKI et al, 1997), a poligalacturonase de *Clostridium thermosulfurogenes* e a exopoligalacturonase de *Thermatoga maritima* (PARISOT et al., 2003; SCHINK; ZEIKUS, 1983).

Poucos fungos termofílicos pectinolíticos têm sido isolados (MAHESHWARI et al., 2000) e, da mesma forma, poucos dados são encontrados na literatura sobre a produção de pectinases por fungos termofílicos. Inamdar (citado por MAHESHWARI, 2000) estudou 40 fungos termofílicos, dos quais, apenas sete gêneros foram capazes de crescer em meio líquido contendo pectina. Desses, a maioria não mostrou atividades de poligalacturonase detectável no meio. Somente a espécie *Thermoascus aurantiacus* produziu quantidades consideráveis de pectinase em meio a base de casca de citrus. A poligalacturonase produzida por esse fungo foi também estudada por MARTINS et al. (2002) a qual mostrou atividade ótima de 70°C e estabilidade por duas horas a 60ºC.

SATHISH-KUMAR; PALANIVELU (1998) relataram a produção de poligalacturonase por *Thermomyces lanuginosus*, cuja temperatura ótima tingiu 70°C em sua forma bruta, a qual, após a purificação, apresentou temperatura ótima de 60°C (SATHISH-KUMAR; PALANIVELU, 1999). As pectinases produzidas por essa espécie ainda foram descritas por PURCHART et al. (1999).

3.3- Xilanases termoestáveis

O biobranqueamento da polpa por xilanases, em substituição ao Cloro, promove a remoção da xilana ligada ao complexo lignina–carboidrato facilitando a lixiviação da lignina. Por outro lado, o tratamento do material com xilanase na fase de pré-cozimento, ajuda a desorganizar a estrutura da parede celular, facilitando, também, as etapas iniciais do processo (NIEHAUS et al., 1999).

Desde que a madeira usada para a produção de polpa é tratada a altas temperaturas (acima de 70°C) e em pH alcalino, a etapa enzimática requer

enzimas termoestáveis e com alta estabilidade e atividade em pH alcalino. Além disso, é necessário que o preparado enzimático seja livre de celulases, para evitar o ataque às fibras de celulose, que tenha xilanases com baixo peso molecular, para facilitar sua difusão na polpa, e ser muito ativa, para reduzir custo (TECHAPUM et al., 2003; HARRIS et al., 1997; ANAND et al., 1990).

As xilanases comerciais como as Pulpazyma e Cartazyma não são termoestáveis o suficiente (atividade ótima 50-60°C e meia vida a 55°C) para evitar a necessidade de um resfriamento da polpa após o tratamento alcalino (BRUINS et al., 2001).

Inúmeros trabalhos têm reportado a produção de xilanases alcalinas e termoestáveis por organismos termofílicos e hipertermofílicos, procariotos e eucariotos. As atividades das xilanases termoestáveis descritas têm variado de 60 a 100°C (PALACKAL et al., 2004; KOHILU et al., 2001; MARJAANA et al., 1994; RUTHERSMITH et al., 1992; MEDDA; CHANDRA, 1980).

Bactérias termofílicas têm se mostrado boas produtoras de xilanases termoestáveis como o *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *Steptomyces* sp, *Thermoactonomyces thalophilus* sub grupo C e *Thermatoga* sp, cujas enzimas atuam a 80°C (KOHILU et al., 2001; DHILLON; KHANNA, 2000; BRECCIA et al., 1997; SIMPSON et al., 1991). Entre os fungos, destacam-se o *Thermoascus aurantiacus*, *Fusarium proliferatum*, *Thermomyces lanuginosus*, *Humicola insolens*, *H. lanuginosa* e *Paelomyces variotim* com xilanases atuando entre 50 e 80°C (DAMASO et al., 2003; BADAL, 2002; KALEGORIS et al, 1998; GOMES et al., 1993; ANAND, et al., 1990; KHANDKE et al., 1989; TAN et al., 1987).

A endo-β-xylanase foi isolada também a partir de cultivo de hiperthermofilicos *Thermatoga* sp, *T. marítima, T. neapolitana, T. themarum*, *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* e *Sulfolobus solfataricus* cujas temperaturas ótimas de atividade ficam em torno de 90°C (CANNIO et al., 2004; SAUL et al., 1995; LEUSHENER; ANTRANIKIAN, 1995; WINTHERHALTER; LIEGH, 1995; LEE et al., 1993).

unesp

4- Conclusões, perspectivas de problemas a serem resolvidos e relação com a linha de pesquisa desenvolvida.

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

Por outro lado, a caracterização de enzimas de mesofílicos tem revelado enzimas com temperaturas ótimas de atividade bastante elevadas, além de resistência a termoinativação muito semelhante àquelas dos termofílicos. Qual o significado adaptativo e vantagem biológica da preservação da termoestabilidade dessas proteínas ao longo do processo evolutivo?

Buscando uma resposta para esta questão, nossa proposta de pesquisa nessa linha consiste na busca de linhagens microbianas termofílicas produtoras de amilases, pectinases e β-glucosidase termoestáveis, com interesse principalmente nos fungos, cujas informações na literatura são bastante restritas. Essas enzimas têm sido caracterizadas e uma pectinase e uma β-glucosidase termoestável foram purificadas. A perspectiva para continuidade dessa pesquisa, está na ampliação da mesma através de um projeto temático, no qual enzimas com estabilidade a temperaturas acima de 50°C, produzidas por microrganismos mesofílicos e termofílicos serão purificadas e suas características bioquímicas e cinéticas, comparadas. O seqüenciamento dessas proteínas, a identificação dos genes e estudos evolutivos também serão metas do projeto, o qual contará com pesquisadores das áreas de Microbiologia, Bioquímica, Genética e Biologia Molecular.

unesp

Referências

ADAMS, P.R.. Extracellular amylase activity of *Rhizomucor pusillus* and *Humicola lanuginosea* at initial stages of growth. **Mycologia**, v.128, p.139-141, 1994.

ADAMS, M.W.W. Enzymes and proteins from organisms that grown near and above 100°C. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.47, p.627-658, 1993.

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

ANAND, L.; KRISHNAMURTY, S.; VITHAYATHIL, P.J. Purification and properties os xylanase from the themophilic fungus *Humicola lanuginosa* Bunce. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.276, p.546-553, 1990.

AQUINO, A.C.M.M.; JORGE, J.A.; TERENZI, H.F.; POLIZELI, M.L. Studies on thermostable alpha-amylase from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Appl. Microb. Biotec.**, v.61, p.323-328, 2003.

ARNESEN, S.; ERIKSEN, S.H.; OLSEN, J.; JENSEN, B. Increased production of α-amylase from *Thermomyces lanuginosus* by the addition of tween 80. **Enzyme Microb. Technol.**, v.23, p.249-252, 1998.

ARNOLD, F.H.; WINTRODE, P.L.; MIYAZAKI, K.; GERSHENSON, A. How enzymes adapt: lessons from direct evolution. **Trend Biochem. Sc.**, v.26, p.100-106, 2001.

BADAL, C. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. **Proc. Biochem.**, v.37, p.1279-1284, 2002.

BISMUTO, E.; NUCCI, R.; FEBBRAIO, F. Effects induced by mono and divalent cátions on protein regions responsible for thermal adaptation in beta-glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*. **Eur. Biophys. J. Biophys.**, v.33, p.39-49, 2004.

BRAGGER, J.M.; DANIEL, R.M.; COOLBEAR, T; MORGAN, H.W. Very stable enzymes from extremely thermostable archaebacteria and eubacteria. **Appl. Microbiol., Biotechnol,** v.31, p.556-561, 1989.

BRECCIA, J.; SINERIZ, F.; BAIGONI, M.D.; GUILLERMO, R.C.; HATTI-KAUL, R. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. **Enzyme Microb.Technol**., v.22, p.42029, 1997.

BRUINS, M.; JANSSEN, A.E.M.; BOOM, R. Thermozyme and their applications. **Appl. Biochem. Biotechnol**., v.90, p.155-190, 2001.

CAMPOS, L.; FÉLIX, C.R. Purification and characterization of a glucoamylase from *Humicola grisea*. **Appl. Environ. Microbiol**., v.61, p.2436-2438, 1995.

CANNIO, R.; DI PRIZITO, N.; ROSSI, M. Xylan degrading strain of *Sulfolobus solfataricus*: isolation and characterization of the xylanase activity. **Extremophiles**, v.8, p.117-124, 2004.

CEREIA, M., TERENZI, H.F., JORGE, J.A., GREENE, L.J., ROSA, J, POLIZELI, M.L. Glucoamylase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **J. Basic**. **Microbiol**., v.40, p.83-92, 2000.

CHUNG, Y.C.; KOBAYASHI, T.; KANAI, H., AKIBA, T.; KUDO, T. Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic acheon *Thermococcus profundu*s DT5432. **Appl. Eviron. Microbiol**., v.61, p.1502-1506, 1995.

DAMASO, M.C.T.; ANDRADE, F.M.C.; PEREIRA, N. Production and properties of cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145. **Braz. J. Microbiol**., v.33, p.333-338, 2003.

DANIEL, R.M. The upper limits of enzyme thermal stability. **Enzyme Microb. Technol**., v.19, p.74-79, 1996.

DE ROSA, M., MORANA, A., RICCIO, A,. GAMBACORTA, A., TRINCONE,A. INCANI, O. Lipids of the archeae : a new tool for bioeletctronis. **Biosens. Bioelectr**., v.9, p.669-675, 1994.

DEMIRIJAN, D.; MORIS-VARAS, F.; CASSIDY, C. Enzymes from extremophiles. **Curr, Opin. Chem. Biol**., v.5, p.144-151, 2001.

DHILLON, A., KHAMA, S. Production of a thermostable xylanase from *Bacillus circulans* AB16 grown on wheat straw. **World J. Microbiol. Biotechnol**., v.27, p.144-151, 2000.

ELCOCK, A,H. The stability of salt bridges at high temperatures: Implications for hyperthermophilic proteins. **J. Mol. Biol.,** v.284, p.489-502, 1998.

ELLIS, R.J. Proteins as molecular chaperons. **Nature**, v.328, p.378-379, 1987.

FÁGÁIN O. C. Understanding and increasing protein stability. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1252, p.1-14, 1995.

GOMES, J.; GOMES, I.; KREINER, W.; ESTERBAUER, H.; SINNER,M.; STEINER, W. Production of high level of cellulase-free and thermostable xylanase by a wild strain of *Thermomyces lanuginosus* using beechwood xylan. **J. Biotechnol**., v.30, p.283-297, 1993.

GRAZIANO, G.; BARONE, G.; CATANZANO, F.; RICCIO, A. The extra-stability of thermophilic globular proteins: a thermodynamic approach. **Therm. Acta**, v.270, p.381-392, 1995.

GRZYBOWSKA, B.; SZWEDA, P.; SYNOVIECKI, J. Cloning of the thermostable alpha-amylase gene from *Pyrococcus woesei* in Escherichia coli- Isolation and some properties of enzyme. **Mol. Biotechnol**., v.26, p.101-109, 2004.

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

HANG, Y.D.; WOODAMS, E.E. Characterization of glucoamylase from *Neosartorya fischeri.* **Lebensm. Wis. Technol**., v.26, p.483-484, 1993.

HARRIS, G.W., PICKERSGILL, W., CONNERTON, I., DEBEIRE, P., TOUZEL, J.P., BRETON, C., PEREZ, S. Structural basis of the properties of an industrially relevant thermophilic xylanase. **Proteins**, v.29, p. 77-86, 1997.

HUBER, R., EDER, W., HELDWEIN, S., WANNER, G., HUBR,H., RACHEL, R., STETTER, K.O.*Thermocrinis rubber* gen. nov. sp. nov., a pink-filament-forming hyperthermophilic bacterium isolated from Yellowstone National Park. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.64, p.3576-4583, 1998.

HUBER, R.; LANGWORTHY, T.A.; KÖNIG, H.; THOMM,M.; WOESE, C.R.; SLEYTR, U.B.; STETTER, K.O. *Thermatoga maritima* sp nov. represents a new genus of unique thermophilic eubacteria growing up to 90°C. **Arch. Microbiol.**, v.144, p.324-333, 1986.

HUBER, R.; WILHARM, T.; HUBER, D.; TRINCONE, A.; BURGGRAF, S.; KÖNIG, H., RACHEL, I.; ROCKINGER, I.; FRICKE, H.; STETTER, K.O. *Aquiflex pyrophilus* gen. nov.sp.nov., represents a novel group of marine hiperthermophilic hydrogen-oxiding bacteria. **Syst. Appl.Microbiol.**, v.25, p.340-351, 1992.

HUSER, B.S.; PATEL, B.K.; DANIEL, R.M.; MORGAN, H.W. Isolation and characterization of a novel extremely thermophilc anaerobic, chemoorganotrophic eubacterium. **FEMS Microbiol. Letter**, v.37, p.121-127, 1986.

HYUN, H.H.; ZEIKUS, J.G.. General biochemical characterization of thermostable extracellular β-amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*. **Appl. Eviron. Microbiol.**, v.49, p.1162-1167, 1985.

JAENICKE, R. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. **Eur. J. Biochem.**, v.202, p.715-728, 1991.

JAENICKE, R.; BÖHM, G. The stability of proteins in extreme environments. **Curr. Opin. Strut. Biol.**, v.8, p.738-748, 1998.

JAYACHANDRAN, S.; RAMABADRAN, R. Production of amylase by *Thermoascus aurantiacus*. **Indian J. Exp. Biol.**, v.8, p.344-345, 1970.

KALOGERIS, E.; CHRISTALKOPOULOS, D.; KEKOS, D.; MACRIS, B.J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isoenzymes. **L. Biotechnol.**, v.60, p.155-163, 1998.

KARSHIKOFF, A.; LADENSTEIN, R. Proteins from thermophilic and mesophilic

organisms essentially do not differ in packing. **Protein Eng.**, v.11, p.867-872, 1998.

KASHYAP, D.R.; SONI, S.K.; TEWARI, R. Enhanced production od pestinases by *Bacillus* sp DT7 using solid state fermentation. **Biores. Technol.**, v.88, p.251-254, 2003.

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

KHANDKE, K.; VITHAYATHIL, P.J.; MURTHY, S.K. Purification of xylanase, β-glucosidase, endocellulase and exocellulase from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.274, p.491-500, 1989.

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

KOCH, R.; SPREINAT, K.; LEMKE, K.; ANTRANIKIAN, G. Purification and properties of a hyperthermoactive α-amilase from a newly isolated *Pyrococcus furiosus*. **Arch. Microbiol.**, v.155, p.572-578, 1991.

KOHILU, U.; NIGAM, P.; SINGH, D.; CHAUDHARY, K. Thermostable alkalophilic and cellulose free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* sub grupo C. **Enzyme Microb. Technol.**, v.28, p.606-610, 2001.

KOZIANOWSKI, G.; CANGANELLA, F.; RAINEY, F.A.; HIPPE, H.; ANTRANIKIAN, G. Purification and characterization of themostable pectate-lyases from a newly isolated thermophilic bacterium *Thermoaerobacter italicus* so nov. **Extremophiles**, v.1, p.171-182, 1997.

KULAKOVA, L.; GALKIN, A.; NAKAYAMA, T. Cold-active esterase from *Psychrobacter* sp Ant 300: Gene cloning, characterization and the effects of Gly ->Pro substitution near the active site on its activity. **BBA Prot. Proteom**, v.1696, p.59-65, 2004.

KUMAR, S.; NUSSINOV, R. How do thermophilic proteins deal with heat? A review. **Cell Mol. Life Sci.**, v.58, p.1216-1233, 2001.

LASA, I.; BERENGUER, J. Thermophilic enzymes and their biotechnology potential. **Microbiologia**, v.9, p.77-89, 1993.

LEA, A.G.H. Enzymes in the production of beverages and fruit juices. In: TUCKER, G.A. ; WOODS, L.F.J. **Enzymes in Food Processing**, 2th ed, Backie Academic & Professional, Glasgow, 1998, p.223-247.

LEE, Y.E.; LOWE, S.E.; HENRISSAT, B.; ZEIKUS, J.G. Characterization of the active site and thermostability regions of endoxylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. **J. Bacteriol.**, v.175, p.5890-5898, 1993.

LEGIN, E.; LADRAT, C.; GODFROY, A.; BARBIER, G.; DUCHIRON, F. Thermostable amylolytic enzymes of thermophilic microorganisms from deep-sea hydrothermal vents. **Coptes Rend. Acad. Sci.**. v.320, p.893-898, 1997.

LEUSCHNER, C.; ANTRANIKAN, G. Heat stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms. **World, J. Microbiol. Biotechnol.**, v.11, p.95-114, 1995.

LOPEZ, G. DNA supercoiling and temperature adaptations: a clue to early diversification of life. **J. Mol. Evol.**, v.46, p.439-452, 1999.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 461-488, 2000.

MANDIGAN, M. T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **BROCK Biology of Microorganisms**, Prentice Hall International Inc., New York, 10ª ed., 2003, 1019 P.

MARJAANA, R.; INDRA, M.; BIRGITTE, A.; LIISA, V. Application of thermostable xylanase of *Dictyoglomus* sp in enzymatic treatment of Kraft pulps. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.41, p.130-139, 1994.

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

MATSUMURA, M.; SIGNOR, M.G.; MATHEUS, B.W. Substantial increase of protein stability by multiple dissulfite bonds. **Nature**, v.342, p.291-293, 1989.

MEDDA, S.; CHANDRA, K. New strains of *B. licheniformis* and *B. coagulans* producing thermostable α-amilases active at alkaline pH. **J. Appl. Bacteriol.**, v.48, p.47-58, 1980.

MOUCHCCA, J. Thermophilic fungi: Biodiversity and taxonomic status. **Crypt. Mycol.**, v.18, p.19-69, 1997.

MOZHAEV, V.V. Mechanisms-based strategies for protein thermostability. **Trends Biotechnol.**, v.11, p.88-95, 1992.

MRABET, N.T., VAN DEN BROCK, A., VAN DEN BRANDE, I., STANSSENS, P., VAN TILBEURGH, H., LAMBEIR, A.M., MATHIJSSENS, J.,, JANIN, J., QUAX W.J., LASTERS, I., DE MEYER, M., WODAK, S.J. Arginine residues as stabilizing in proteins. **Biochemistry**, v.31, p.2239-2553, 1992.

MUKLHOPADHYAY, A.; HAGRA, PP.; SENGUPTA, T.; Protein-protein interaction conferring stability to an extracellular acetyl (xylan) esterase produced by *Termitomyces clypeatus*. **Biotechnol. Progr.**, v.19, p.700-726, 2003.

NIEHAUS, F.; BERTOLDO, C.; KAHLER, C.; ANTRANIKIAN, G. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotchenol.**, v.51, p.711-729, 1999.

NIELSEN, B.R.; LEHMBECK, J.; FRANDSEN, T. Cloning, heterologous expression and enzymatic characterization of a thermostable glucoamylase from *Talaromyces emersonii*. **Protein Expres. Purific.**, v.26, p.1-8, 2002.

NIGAM, P.; SINGH, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. **Enzyme Microb. Technol.**, v.17, p.770-778, 1995.

unesp

NGUYEN, Q.D.; REZESSY-SZABÓ, J.M.; CLAEYSSENS, M.; STALS, I.; HOSCHKE, Á. Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. **Enzyme Microb. Technol**., v.31, p.345-352, 2002.

PALACKAL, N.; BRENNAN, Y.; CALLEN, W.N.; DUPREE, P.; FREY, G.; GOUBET, F.; STEER, B.A. An evolutionary route to xylanase process fitness. **Prot. Sc**, v.13, p.494-503, 2004.

PARISOT, J.; LANGLOIS, V.; SAKAMYAN, V. Cloning expression and characterization of a thermostable exopolygalacturonase from *Thermatoga maritima*. **Carb. Res**., v.338, p.1333-1337, 2003.

PUCHART, V.; KATAPODIS, P.; BIELY, P.; KREMNICKÝ,A.; BHAT, M.K. Production of xylanases, manases and pectinases by the tehrmophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme Microb. Technol**., v.24, p.355-361, 1999.

RÖNAZZÉKI, G.; NGUYEM. Q.D.; REZESSY-SZABÓ, J.M.; HOSCHKE, Á.; BHAT, M.K. Screening the strains of thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* for amylolytic activities. **Acta Alimen**., v.29, p.71-79, 2000.

RUTHRSMITH, L.; DANIEL, R. Cellulytic and hemicellulytic enzymes functional above 100°C. **Ann.NY Acad. Sci**., v.672, p.137-141, 1992.

SAHA, B., ZEIKUS, J.G. Characterization of thermostable α-glucosidase from *Clostridium thermohydrosulfuricum* 39E. **Appl. Microbiol. Biotechnol**., v.35, p.568-571, 1991.

SAHA, B.; ZEIKUS, J.G.. Novel highly thermostable pullulanase from thermophiles. **Trends Biotechnol**., v.7, p.243-239, 1989.

SATHISH-KUMAR, S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracelular polygalacturonase from thermophilic fungus *Thermomyces laniginosus*. **World. J. Microbiol**. **Biotechnol**., v.15, p.643-646, 1999.

SATHISH-KUMAR, S.; PALANIVELU, P. Production and properties of pectinolitic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces laniginosus*. **World. J. Microbiol**. **Biotechnol**., v.14, p.781-782, 1998.

unesp

SAUL, D.; WILLIAMS, L.; REEVES, R.; GIBBS, M., BERGQUIST, P. Sequence and expression of a xylanase gene the hyperthermophile *Thermatoga* sp strain FjSS3-B1 and characterization of the recombinant enzyme and its activity on kraft pulp. **Appl. Environ.Microb.**, v.61, p.4110-4113, 1995.

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

SCHINK, B.; ZEIKUS,J.G. Characterization of pectinolytic enzymes of *Clostridium thermosulfurogenes*. **FEMS Microbiol. Letters**., v.17, p.295-298, 1983.

SCHMIDT-DANNERT, C.; ARNOLD, F.H., Direted evolution of industrial enzymes. **Trends Biotechnol**., v.17, p.135-136, 1999.

SCHUMANN, J.; WRBA,A.; JAENIKE, R.; STETTER, K.O. Topographical and enzymatic characterization of amylases from extremophilic eubacterium *Thermatoga maritima*. **FEBS Letter**, v.282, p.122-126, 1991.

SHIMA, S.; THAUER, R.K.; ERMLER, U. Hyperthermophilic and salt-dependent formyl transferase from *Methanopyrus kandleri*. **Biotechnol. Soc. Transac**., v.32, p.269-272, 2004.

SHIRAKI, K.; NISHIKORI, S.; FUJIWARA, S.; HASHIMOTO, H.; KAI, Y.; TAKAGI, M.; IMANAKA, T. Comparative analyses of the conformational stability of a thermophilic protein and its mesophilic counterpart. **Eur. J. Biochem**., v.268, p.4144-4150, 2001.

SILVA, W.B., PERALTA, R.M. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *Aspergillus fumigatus*. **Can. J. Microbiol**., v.44, p. 493-497, 1998.

SIMPSON, H.; HAUFLER, U.; DANIEL,K. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermatoga*. **Biochem. J**., v.277, p.177-185, 1991.

SINGH, S.A.; PLATTNER, H.; DIEKMAN, H. Exopoligalacturonase lyase from a thermophilica *Bacillus* sp. **Enzyme Microb. Technol**., v.25, p.420-425, 1999.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

SINGH, S.; PILLAY, B.; PROR, A. Thermal stability of β-xylanases produced by different *Thermomyces lanuginosus* strains. **Enzyme Microb. Technol.**, v.26, p.502-508, 2000.

SOMKUTI, G.A.; STEINBERG, D.H. Thermoacidophilic extracellular α-amylase of *Mucor pusillus*. **Devl. Ind. Microbiol**, v.21, p.327-337, 1980.

SPECKA, U.; MAYER, F.; ANTRANILIAN, G. Purification and properties of a thermoactive glucoamylase from *Clostridium thermosaccharoluticum*. **Appl. Environm. Microbiol.**, v.57, p.2317-2323, 1991.

STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, N.P.; COELHO, L.C.B.B.; ARAÚJO, J.M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp endophyte of maize leaves. **Biores. Technol.**, v.83, p.105-109, 2002.

STETTER, K.O. Extremophiles and their adaptation to hot environments. **FEBS Letters.**, v.452, p.22-25, 1999.

STETTER, K.O..Hyperthermophilic procaryotoes. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.18, p.149-158, 1996.

SUZUKI, Y.; HATAGAKI, K.; ODA, H. A hyperthermostable pullulanase produced by an extreme themophile *Bacillus flavocaldarius* KP 1228 and evidence for the proline theory of increasing protein thermostability. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.34, p.707-714, 1991.

TACHIBANA, Y.A.; KURAMURA, A.; SHIRASAKA, N.; SUZUKI, Y.; YAMAMOTO, T., FUJIWARA, S.; TAKAGI, M.; IMANAKA, T. Purification and characterization of an extremely thermostable cyclomaltodextrin transferase form a newly isolated hyperthermophilic archeon, a *Thermococcus* sp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.65, p.1991-1997, 1999.

TAN, L.U.L.; MAYERS, P.; SADDLER, J.N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Can. J. Microbiol.**, v.33, p.689-692, 1987.

TAYLOR, P.M.; NAPIER, E.J.; FLEMING, I.D. Some properties of a glucoamylase produced by the thermophilic fungus H*umicola lanuginosa*. **Carboydrates Res**., v.61, p. 301-308, 1978.

TCHAPUN, C.; POOSARAM, N.; WATANABE, M.; Thermostable and alkalineptolerant microbial cellulose-free xulanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocess: a review. **Process Biochem**. V.38, p.1327-1340, 2003.

TEAGUE, W.M.; BRUMM, P.J. Commercial enzymes for starch hydrolysis products. In: SCHENK, F.W.; HEBEDA, R.E. **Starch Hydrolysis Products**, VCH Publishers, 1992, p.45-77.

THOMAS, T.; CAVIOCHIOLI, R. Archeal cold-adapted proteins: structural and evolutionary analysis of the elongation factor e proteins from psychrophilic, mesophilic and thermophilic methanogens. **FEBS Letters**, v.439, p.281-286, 1998.

TOLNER, B.; POOLMAN, B.; KONINGS, W.N. Adaptation od microorganisms and their transport systems to high temperatures. **Comp. Biochem. Physiol**., v.118A, p.423-428, 1997.

TOMAZIC, S.; LIBANOV, A.M. Mechanisms of irreversible thermal inativation of α-amylase of *Bacillus*. **J. Biol. Chem**.., v. 263, p.3086-3091, 1988.

VIELLE, C.; BURDETTE, D.S.; ZEIKUS, J.G. Thermozymes. **Biotechnol. Ann. Rev**., v.2, p.1-83, 1996.

VIELLE, C.; ZEIKUS, G.J. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microb. Mol. Biol. Rev**., v.65, p.1-43, 2001.

VIENEN, M. Relationship of protein flexibility to thermostability. **Protein Eng**., v.1, p.477-480, 1987.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de Bioquímica**, Trad. NETTO, A.G. et al., Ed. Artmed S.A.., Porto Alegre, 2002, 931p.

WANG, C.; EUFEMI, M.; TURANO, C.; GIARTOSIO, A. Influence of the carbohydrates moiety on the stability of glycoproteins. **Biochemistry** , v.35, p.7299-7307.

WINTHERHALTER, C.; LIEGH, W. The extremely thermostable xylanases pf the hyperthermophilic bacterium *Thermatoga maritima* **MSBS. Appl. Environ. Microbiol.**, v.61, p.1810-1815, 1995.

YONGSMITH, B.; KITPRECHACANICH, V.; CHITRADON, L.; CHAISRISOOK, C.; BIDDA, N. Color mutants of *Monoascus* sp KB9 and their comparative glucoamylases on rice solid culture. **J. Mol. Cat. B: Enz.**, v.10, p.263-272, 2000.

Purification and Characterization of Two β-Glucosidases from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*

E.R. DE PALMA-FERNANDEZ[a], E. GOMES[b], R. DA SILVA[b]*

[a]*Centro Universitário de Rio Preto, São Paulo, Brazil*
[b]*Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brazil.*

e-mail: dasilva@qeg.ibilce.unesp.br

Received 4 December 2001
Revised version 13 May 2002

ABSTRACT. β-Glucosidase from the fungus *Thermoascus aurantiacus* grown on semi-solid fermentation medium (using ground corncob as substrate) was partially purified in 5 steps – ultrafiltration, ethanol precipitation, gel filtration and 2 anion exchange chromatography runs, and characterized. After the first anion exchange chromatography, β-glucosidase activity was eluted in 3 peaks (GI-1, GI-2, GI-3). Only the GI-2 and GI-3 fractions were adsorbed on the gel matrix. GI-2 and GI-3 exhibited optimum pH at 4.5 and 4.0, respectively. The temperature optimum of both glucosidases was at 75–80 °C. The pH stability of GI-2 (4.0–9.0) was higher than GI-3 (5.5–8.5); both enzyme activities showed similar patterns of thermostability. Under conditions of denaturing gel chromatography the molar mass of GI-2 and GI-3 was 175 and 157 kDa, respectively. Using 4-nitrophenyl β-D-glucopyranoside as substrate, K_m values of 1.17 ± 0.35 and 1.38 ± 0.86 mmol/L were determined for GI-2 and GI-3, respectively. Both enzymes were inhibited by Ag^+ and stimulated by Ca^{2+}.

Cellulose is the main component of plant cell walls and the most abundant organic compound on earth and a renewable energetic source that can be used for producing alternative fuels such as ethanol (Yoshida *et al.* 1989). Ethanol produced from lignocellulosic biomass is an excellent fuel for internal combustion engines and substitution of fossil fuels can decrease air pollution and global heating (Philippidis *et al.* 1995). The enzymic saccharification of cellulosic material to glucose involves the synergistic action of at least three different enzymes: endo-β-1-4-glucanase (EC 3.2.1.4), exo-cellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) and β-glucosidase (β-D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21). Endoglucanase and exo-cellobiohydrolase act upon cellulose to produce cellobiose as final product; both these enzyme activities are often inhibited by cellobiose (Coughlan 1985; Woodward *et al.* 1985). β-Glucosidase has a crucial role in enzymic degradation of cellulose. This enzyme hydrolyses cellobiose to glucose, reducing the inhibitor effect of cellobiose on endoglucanase and exo-cellobiohydrolase. β-Glucosidase is thus probably the rate-limiting step controlling the velocity of the enzymic reaction of cellulose saccharification once it prevents the disaccharide accumulation (Sengupta *et al.* 1991).

Though a large number of cellulose hydrolyzing microorganisms has been described (cf. *e.g.*, Pardo and Forchiassin 1999; Augustin 2000; Kolarova and Augustin 2001), few of them are of industrial interest: the most frequently used are fungi from the genera *Aspergillus*, *Humicola*, *Phanerochaete*, *Schizophillum*, *Talaromyces* and *Trichoderma* (which is considered one of the best producers of cellulolytic enzymes).

The main role of β-glucosidase is cellobiose and cello-oligosaccharide hydrolysis. The enzyme synthesis depends on several factors such as culture age, the presence of inducer compounds in the medium, and adequate intracellular levels of nutrients and minerals. β-Glucosidase has a large potential for application in food processing, *e.g.*, in wine and orange juice production. This enzyme is able to hydrolyze anthocyanins, producing anthocyanidins and sugars. The resulting aglycones possess little color and are less soluble than anthocyanins, tend to precipitate and can be more easily removed. This is important particularly in processing in orange-juice industry since it contributes to elimination of anthocyanins that promote the change of juice color during pasteurization. This enzyme has also been used to achieve desirable color of pale red wine (Martino *et al.* 1994). In additions, β-glucosidase is an important factor in cellulose degradation to glucose and its subsequent fermentation to ethanol in fuel production.

All this leads to intense efforts to establish large-scale use of β-glucosidase in industry. Purified thermostable β-glucosidases from thermophilic strains of *Chaetomium thermophile* (Lusis *et al.* 1973), *Tala-*

*Corresponding author

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

romyces emersonii (McHale *et al.* 1981), *Thermoascus aurantiacus* (Khandke *et al.* 1989), *Sporotrichum thermophile* (Bhat *et al.* 1993), *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Peralta *et al.* 1997) have been described. Here we report on the purification and characterization of two β-glucosidases from the thermophilic fungus *T. aurantiacus*.

MATERIAL AND METHODS

Organism and culture conditions. The microorganism *Thermoascus aurantiacus* MIEHE was isolated from decayed wood in Brazil. The fungus was inoculates on slants containing Sabouraud agar and incubated for 5 d at 50 °C. Sterilized distilled water was added to the slants to obtain spore concentration of 10/nL (*i.e.* 10^7 spores per mL). One mL of this suspension was transferred to a 500-mL Erlenmeyer flask containing 20 g of semi-solid medium of ground corncob. After 5 d of incubation at 50 °C, 100 mL of distilled water was added to the flasks and they were maintained under occasional shaking for 1 h at room temperature. The contents were filtered (Whatmann no. 1 filter paper) and culture filtrate was used for enzyme activity assays.

Enzyme assay. β-Glucosidase was routinely assayed by using a reaction mixture containing 50 µL of culture filtrate, 250 µL of 0.1 mol/L sodium acetate buffer (pH 5) and 250 µL of 0.2 mol/L 4-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (PNPG; *Sigma*). After incubation (60 °C, 10 min), the reaction was stopped by adding 2 mL of 2 mol/L sodium carbonate, and the color, developed as a result of 4-nitrophenol liberation, was measured at 410 nm; β-glucosidase activity is expressed in nkat (release of 1 nmol of 4-nitrophenol per s). Protein content was determined according to Lowry using bovine serum albumin as standard.

β-Glucosidase purification. All steps were carried out at room temperature, except for ethanol precipitation, which was performed at –18 °C; β-glucosidase activity was measured after every purification step.

Step *1* – ultrafiltration. The culture filtrate was subjected to ultrafiltration on the Minitan™-*Millipore* System.

Step *2* – ethanol precipitation. The product of ultrafiltration was cooled to –18 °C on ice by adding slowly ethanol (70 % saturation, *V/V*). The mixture was incubated at 4 °C overnight, and the precipitate collected by centrifugation (10 000 *g*, 10 min, 4 °C).

Step *3* – gel-filtration chromatography. The precipitate suspended in 50 mmol/L sodium acetate buffer (pH 5) was loaded on a Sephadex G-100 column (20 × 1000 mm; *Pharmacia*) previously equilibrated with the same buffer. The fractions containing β-glucosidase activity were pooled.

Step *4* – ion-exchange chromatography. The dialyzed fraction pool containing β-glucosidase activity was loaded on Q-Sepharose XR50 (50 × 80 mm; Pharmacia) pre-equilibrated with 50 mmol/L sodium acetate buffer (pH 5). The column was washed exhaustively with equilibrating buffer to wash off unbound proteins; the bound proteins were eluted with a linear gradient of 0.1–0.4 mol/L NaCl in buffer; protein content was monitored at 280 nm.

Step *5* – ion-exchange chromatography. After elution from Q-Sepharose column, the GI-2 pool containing β-glucosidase activity was concentrated using Centriprep-10, dialyzed overnight against 50 mmol/L sodium acetate buffer (pH 5) and loaded again on pre-equilibrated Q-Sepharose (exactly as in step *4*). The proteins were eluted with linear gradient of 100–400 mmol/L NaCl in buffer. The same procedure was performed using the GI-3 pool containing β-glucosidase activity.

Characterization of purified enzymes. Optimum temperature and pH. The effect of temperature on β-glucosidase activity was determined under standard reaction conditions at 50–90 °C; the effect of pH on the activity was determined by using the following buffer systems (mmol/L): sodium acetate 100 (pH 3.0–5.5), citrate–sodium phosphate 100 (5.5–7.0), Tris-HCl 100 (7.0–8.5), glycine–NaOH 100 (8.5–10.0).

Temperature and pH stability. The temperature stability was tested by storing the purified enzymes for 1 h at 20–80 °C before enzyme assay under standard conditions. The pH stability was estimated after storing the purified enzymes for 1 d in different buffers (pH 3–10) at room temperature. The remaining β-glucosidase activity was measured under standard conditions.

Gel electrophoresis. Molar mass and purity of GI-2 and GI-3 were analyzed by SDS-PAGE employing 7.5 % gels according to Laemmli (1970). The gels were stained with silver nitrate (See *et al.* 1989). The molar mass standards of 29–200 kDa were purchased from *Pharmacia*.

Effect of metal ions. $AgNO_3$, $CaCl_2$, $CoCl_3$, $CuSO_4$, $FeCl_3$, $HgCl_2$, KCl, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$ and EDTA at 100 mmol/L were tested. The effector was added to the enzyme solution and incubated for 15 min at room temperature. After the incubation, the enzyme activity was measured. Kinetic constants were determined with 50–400 µmol/L 4-nitrophenyl β-D-glucopyranoside (*Sigma*).

unesp

RESULTS AND DISCUSSION

Ethanol precipitation was shown to be efficient in concentrating the enzyme without any significant loss in activity (Table I). Initial gel filtration (Sephadex G-100) resulted in adsorption of colored substances and also resolved the protein into three large peaks, one of which contained the β-glucosidase activity. Pooled active fractions were dialyzed and loaded on anion-exchanger (Q-Sepharose XR50) from which the fractions containing β-glucosidase activity were eluted as three peaks (Fig. 1). Fraction Gl-1 was eluted with equilibrating buffer; fractions Gl-2 and Gl-3 were adsorbed on Q-Sepharose at pH 5.0; this indicates that the isoelectric point of the corresponding enzymes lies in acidic pH range. Peaks Gl-2 and Gl-3 were used in subsequent purification steps. Finally, two enzyme activities were purified about 71 and 43-fold, with a recovery of 3.2 % and 2.5 % for Gl-2 and Gl-3, respectively. While Gl-2 exhibited specific activity of 12 860 nkat/mg protein, Gl-3 had a lower specific activity (7650 nkat/mg).

Table I. Purification of β-glucosidases from *Thermoascus aurantiacus* MIEHE

Purification step	Total activity μkat	Protein g/L	Total protein mg	Specific activity nkat/mg protein[a]	Yield %	Purification
Crude culture filtrate	211	2.37	2346	90	100.0	1
Ultrafiltration (*1*)	211	2.77	1911	110	99.9	1.2
Ethanol precipitation (*2*)	176	15.3	284	619	83.3	7.0
Gel filtration, Sephadex G-100 (*3*)	824	0.58	44.7	18450	39.0	10.2
Anion-exchange chromatography, Q-Sepharose XR50 (*4*)						
β-glucosidase Gl-2	11.7	0.61	4.57	2546	5.5	14.0
Gl-3	8.40	0.52	3.12	1025	4.0	15.0
Q-Sepharose XR50 (*5*)						
β-glucosidase Gl-2	3.34	0.26	0.26	12860	3.2	71.5
Gl-3	2.68	0.35	0.35	7648	2.5	43.0

[a]The enzyme activity was assayed for 10 min at 60 °C in 0.1 mol/L sodium acetate buffer (pH 5.0); PNPG was used as the substrate.

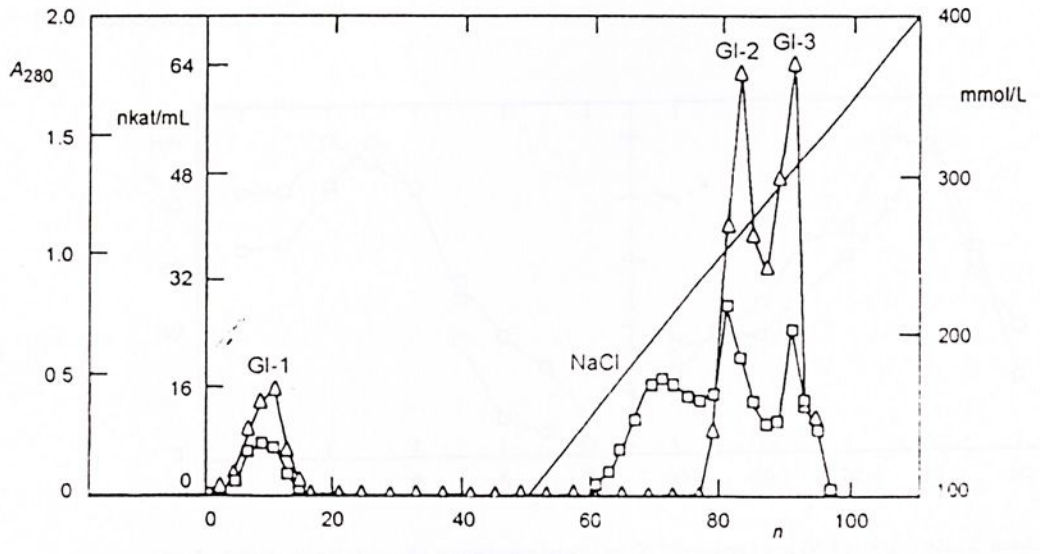


Fig. 1. Elution profile of *T. aurantiacus* culture filtrate on Q-Sepharose XR50. Column was equilibrated with 50 mmol/L sodium acetate buffer (pH 5.0); flow rate of 24 mL/h, elution with 100–400 mmol/L NaCl linear gradient in extraction buffer; fraction size 8.4 mL; *n* – number of fraction; A_{280} – protein concentration, *squares*; Gl-1, Gl-2 and Gl-3 β-glucosidase activity (*triangles*; nkat/mL).

As the cellulolytic activity in fungi and bacteria was shown to be caused by a mixture of hydrolytic enzymes the purification of enzymes is considered to be an important procedure aiming at the characteriz-

ation of the biochemical properties of individual enzymes. Tong *et al.* (1980) purified a β-glucosidase from the culture filtrate of *T. aurantiacus* grown on yeast–glucose agar using the Sephadex G-100 column. In our study this resin was not efficient in separating the enzymes. Similarly to the purification of several other β-glucosidases (Chen *et al.* 1992; Gueguem *et al.* 1995; Rashid *et al.* 1997; Traon-Masson *et al.* 1998) we showed the use of ion-exchange chromatography to be crucial.

SDS-PAGE analysis followed by silver staining of the purified Gl-2 and Gl-3 enzymes indicated the presence of single bands of 175 and 157 kDa, respectively (Fig. 2). Other β-glucosidases purified from different organisms exhibit different molar masses – *Xylaria regalis* (85 kDa; Wei *et al.* 1966); *Aspergillus niger* (323; Alconada *et al.* 1996), *Acremonium persicinum* (128; Pitson *et al.* 1997), *Aureobasidium pullulans* (165; Saha *et al.* 1994), *T. aurantiacus* 87 kDa (Tong *et al.* 1980) and 98 kDa (Khandke *et al.* 1989).

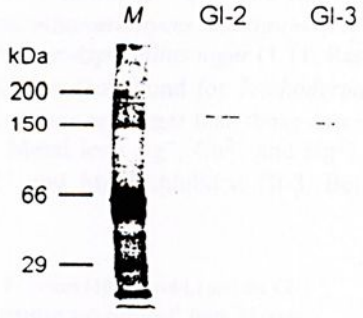


Fig. 2. SDS-PAGE of purified β-glucosidases from *T. aurantiacus*. *M* – molar mass standards (β-amylase 200 kDa, alcohol dehydrogenase 150, bovine serum albumin 66, carbonate dehydratase 29; Gl-2 and Gl-3 – purified β-glucosidases (both 10-μL samples).

The Gl-2 exhibited the maximum activity at pH 4.5, Gl-3 at 4.0. Gl-2 had temperature optimum at 80 °C, Gl-3 at 75 °C (Fig. 3). The optimum pH values of fungal cellulases are generally between pH 3 and 7 (Woodward *et al.* 1982; Coughan 1985; Saha *et al.* 1994). Tong *et al.* (1980) and Khandke *et al.* (1989) reported on two β-glucosidases purified from *T. aurantiacus* with respective pH optima at 5.0 and 4.2; our results correspond to the above reports. The temperature optima of different β-glucosidases obtained from various microbial sources range between 40 and 105 °C (Woodward *et al.* 1982; Coughlan *et al.* 1985; Saha *et al.* 1995). A temperature optimum of 70 °C (Tong *et al.* 1980; Kandke *et al.* 1989) was described for β-glucosidase from *T. aurantiacus*.

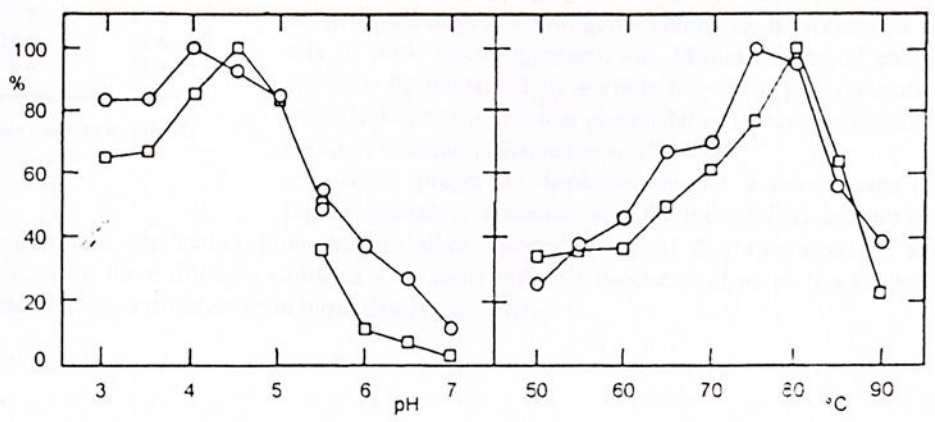


Fig. 3. Effects of pH (*left*) and temperature (*right*) on Gl-2 (*squares*) and Gl-3 (*circles*) from *T. aurantiacus* (%). pH – measured for 10 min at 60 °C in the following 0.1 mol/L buffers: sodium acetate (pH 3.0–5.5), sodium citrate-sodium phosphate (5.5–7.0), Tris-HCl (7.0–8.5), glycine-NaOH (8.5–10.0); temperature (°C) – assayed in 0.1 mol/L sodium acetate (pH 5.0) for 10 min; means of two replicates.

Both β-glucosidases exhibited a high thermostability (without substrate) when incubated for 1 h at 20–70 °C; Gl-3 retained 82 % of activity at 70 °C while Gl-2 retained 75 % of activity under these conditions (*data not shown*). The high thermostability of cellulases is recognized to be an important characteristic of most fungal cellulases since cellulose hydrolysis at higher temperatures is more rapid (Rosenberg 1975). The

Gl-2 was fairly stable at pH 4–9 and Gl-3 at 5.5–8.5 (*data not shown*). The pH stability of β-glucosidases from various fungal sources varies widely – *Xylaria regalis* (pH 5.0–8.0; Wei *et al.* 1996), *Aspegillus niger* 322 (2.0–5.5; Peshin *et al.* 1999), *Trichoderma reesei* (3.6–8.0 for β-glucosidase I and 4.0–6.0 for β-glucosidase II; Chen *et al.* 1992), *Aspergillus niger* (2.0–9.0; Traon-Masson *et al.* 1998), *T. aurantiacus* (6.0–8.0; Tong *et al.* 1980) and a crude β-glucosidase from *T. aurantiacus* (4.0–7.0; Gomes *et al.* 2000). Although we found similarities in β-glucosidase pH and temperature patterns, the purification revealed that Gl-2 and Gl-3 are distinct from the enzymes purified by Tong *et al.* (1980) and Khandke *et al.* (1989); also the subunit sizes were found to be different which can contribute to differences in thermo- and pH stability.

Kinetic constants of the purified enzymes were determined from Lineweaver–Burk plots with PNPG as substrate under optimum conditions. The graphic representation of double-reciprocal $1/v$ *vs.* $1/s$ plot was linear demonstrating the Michaelian behavior of both Gl-2 and Gl-3 enzymes. Gl-2 had a K_m value of 1.17 ± 0.35 mmol/L, Gl-3 1.38 ± 0.86 mmol/L. The v_{lim} values for Gl-2 and Gl-3 were 28.0 ± 6.7 and 22.4 ± 1.45 mmol L^{-1} s^{-1}. The K_m value found for Gl-2 is similar to that reported for different other organisms: *Kluyveromyces marxianus* (1.10 mmol/L; Barron *et al.* 1995), *Aureobasidium pullulans* (1.17; Saha *et al.* 1994) or *Aspergillus niger* (1.11; Rashid *et al.* 1977). The K_m value found for Gl-3 (1.38 ± 0.86 mmol/L) was similar to that found for *Trichoderma reesei* (1.35 mmol/L; Chen *et al.* 1992). However, the Gl-2 and Gl-3 K_m values are larger than those described by Tong *et al.* (1980) (0.52 mmol/L) for the same fungus.

Metal ions Ag^+, Cu^{2+} and Hg^{2+} showed an inhibitory effect on Gl-2 (Table II); Ag^+, Hg^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+}, K^+ and Mg^{2+} inhibited Gl-3. Both enzymes were strongly inhibited by Ag^+ suggesting that thiol groups can be essential for β-glucosidase activity. The activities were not affected by Zn^{2+} and Mn^{2+}. Gl-2 was not affected by the addition of K^+, Co^{2+}, Fe^{2+} and Mg^{2+}. Ca^{2+} was a stimulant with both enzymes; EDTA had a stimulating effect on Gl-2 but an inhibitory effect on Gl-3. Similar dependence on the addition of chelating agents or metallic cofactors was found by Gueguem *et al.* (1995) in β-glucosidase from *Botrytis cinerea*. As many of these metal ions (and also other biologically active substances) are present in the culture medium it is important to maintain their levels below inhibitory concentrations.

Table II. Effectors (100 mmol/L) and the Gl-2 and Gl-3 relative activity (%)[a] from *Thermoascus aurantiacus* MIEHE

Effector	Gl-2	Gl-3
Control	100	100
EDTA	109	70.1
$CaCl_2$	104	106
KCl	91.8	46.8
$MgSO_4$	90.4	56.2
$CoCl_2$	89.1	46.1
$FeCl_3$	88.8	41.2
$MnSO_4$	88.0	95.5
$ZnSO_4$	72.9	69.8
$HgCl_2$	46.9	36.0
$CuSO_4$	33.6	52.6
$AgNO_3$	9.8	31.5

[a]Reaction conditions *see* footnote to Table I.

The difference among the β-glucosidase isoforms obtained in our work and the data presented by other authors with the same organism can be explained by the influence of different carbon sources affecting the growth of these cellulolytic microorganisms (Mandels *et al.* 1974; Wood and McCrae 1982), by strains of different geographical origin (Gomes *et al.* 2000), by the presence of at least two genes coding for β-glucosidase activity in some microorganisms, *etc.* Multiple forms of enzymes can also be explained by various degree of post-translational modifications (*e.g.*, protein glycosylation); they can also be the result of evolution (Stahmann *et al.* 1993).

Some properties displayed by our β-glucosidases (*e.g.*, high temperature optimum and thermostability) are attractive features for future industrial application. In contrast to other reported strains of *T. aurantiacus*, our strain produced β-glucosidase in three different isoforms with some different biochemical properties suggesting that our *T. aurantiacus* strain is different from those described earlier.

This work was funded by *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*, Brazil.

REFERENCE

ALCONADA T.M., MARTINEZ M.I.: Purification and characterization of a β-glucosidase from the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *meloni*. *Lett.Appl.Microbiol.* **22**, 106–110 (1996).

AUGUSTIN J.: Polysaccharide hydrolases of *Aureobasidium pullulans*. *Folia Microbiol.* **45**, 143–146 (2000).

BARRON N., MARCHANT R., MCHALE L., MCHALE A.P.: Partial characterization of β-glucosidase activity produced by *Kluyveromyces marxianus* IMB3 during growth on cellobiose-containing media at 45 °C. *Biotechnol.Lett.* **17**, 1047–1050 (1995).

BHAT K.M., GAIKWAD J.S., MAHESHWARI R.: Purification and characterization of an extracellular β-glucosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* and its influence on cellulase activity. *J.Gen.Microbiol.* **139**, 2825–2832 (1993).

CHEN H., HAYN M., ESTERBUER H.: Purification and characterization of two extracellular β-glucosidases from *Trichoderma reesei*. *Biochim.Biophys.Acta* **1121**, 54–60 (1992).

COUGHLAN M.: The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotech.Genet. Engineer.Rev.* **3**, 39–109 (1985).

Kalogeris, E.; Christakopoulos, P.; Kekos, D. e Macris B.J. (1998), Studies on the solid-substrate production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. *Journal of Biotechnology* v. 60, p.155-163.

Kalogeris, E.; Iniotaki, F.; Topakas, E.; Chriskopoulos, P.; Kekos, D. e Macris, B.J. (2003), Performance of intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw. *Bioresource Technology*, v. 86, p. 207-213.

Krishna, C. (1999), Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresource Technology*, v. 69, p.231-239.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farra, L.; Randall, R.J. (1951), Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol.Chem.* v. 193, p. 267-275.

Matsuura, M.; Obata, A. e Fukushima, D. (1989), Objectionable flavor of soymilk developed during the soaking of soybeans and its control. *Journal Food Science*, Chicago, v. 54, n. 3, p. 602-605.

Miller, G.L. (1959), Use of dinitrossalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428.

Nadalini, M.F.C. (1997), *Caracterização genética e produção de celulases em Trichoderma pseudokoningii*. Rio Claro. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

Palma-Fernandez, E.R.D. (2002), *Purificação e caracterização de duas β-glicosidase do fungo termofilico Thermoascus aurantiascus Miehe*. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

Palma-Fernandez, E.R.D.; Gomes, E. e Da Silva, R. (2002), Purification and Characterization of two β-Glucosidases from Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus Miehe*. *Folia microbioloca*, v. 47, n. 6, p. 685-690.

Park, Y.K.; Aguiar, C.L.; Alencar, S.M. e Scamparini, A.R.P. (2001), Biotransformação de isoflavonas de soja. *Biotecnol. Cien. Desenvolv.* V. 20, p. 12-14.

Persson, I.; Tjerneld, F. e Hahn-Hangerdal, B. (1991), Fungal cellulolytic enzime production: a review. *Process Biochem.* V. 26, p. 65-74.

Peterson, G. e Barnes, S. (1991), Genistein inhibition of the growth of human breast cancer-cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, San Diego, v.179, n.1, p.661-667.

Peterson, G. e Barnes, S. (1993), Genistein and biochanin A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal factor receptor tyrosine autophosphorylation. *The Prostate*, New York, v.22,n.4, p.335-345.

Raimbault, M. (1998), General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* v.1, n.3, p.174-188.

Rodrigues, E.C. (1987), *Caracterização citogenética e bioquimica do fungo celulolitico Humicola sp.* Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agricola). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Sengupta, S. e Ghosh, A.K. (1991), Purification and characterization of a β-glucosidase enzymes from a mushroom Termitomyces clypeatus. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1076, p.215-220.

Smith, M.K. e Gold, M.H. (1979) *Phanerochaete chrysosporium* β-glucosidases: Induction, cellular localization and physical characterization. *Appl.Environ. Microbiol.*, v.37, p.938-942.

Woodward, J. e Arnold, L. (1982), The inhibition of β-glucosidase activity in *Trichoderma reesei* C-30 cellulase by derivaties and isomers of glucose. *Biotechnol. Bioeng.* V.23, n.7, p.1553-1562.

GOMES I., GOMES J., GOMES D.J., STEINER W.: Simultaneous production of high activities of thermostable endoglucanase and β-glucosidase by the wild thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **53**, 461–468 (2000).

GUEGUEN Y., CHEMARDIN P., ARNAUD A., GALZY P.: Purification and characterization of an intracellular β-glucosidase from *Botrytis cinerea*. *Enzyme Microb.Technol.* **17**, 900–906 (1995).

KHANDKE K.M., VITHAYATHIL P.J., MURTHY S.K.: Purification of xylanase, β-glucosidase, endocellulase, and exocellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. *Arch.Biochem.Biophys.* **284**, 491–500 (1989).

KOLAROVA N., AUGUSTIN J.: Production of polysaccharide hydrolases in the genus *Rhizopus*. *Folia Microbiol.* **46**, 223–226 (2001).

LAEMMLI U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).

LUSIS A.J., BECKER R.R.: The β-glucosidase system of the thermophilic fungus *Chaetomium thermophile* var. *coprofile*. *Biochim.Biophys.Acta* **329**, 5–16 (1973).

MANDELS M., HONTZ L., NYSTROM J.: Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechnol.Bioeng.* **16**, 1471–1493 (1974).

MCHALE A., COUGHLAN M.P.: The cellulolytic system of *Talaromyces emersonii*. Purification and characterization of the extracellular and intracellular β-glucosidases. *Biochim.Biophys.Acta* **662**, 152–159 (1981).

PARDO A.G., FORCHIASSIN F.: Factors influencing β-glucosidase production, activity and stability in *Nectria catalinensis*. *Folia Microbiol.* **44**, 71–76 (1999).

PERALTA R.M., KADOWAKI M.K., TERENZI H.F., JORGE J.A.: A highly thermostable β-glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*: purification and biochemical characterization. *FEMS Microbiol.Lett.* **146**, 291–295 (1997).

PESHIN A., MATHUR J.M.S.: Purification and characterization of a β-glucosidase from *Aspergillus niger* strain 322. *Lett.Appl.Microbiol.* **28**, 401–404 (1999).

PHILLIPPDIS P.G., SMITH K.T.: Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Appl.Biochem.Biotechnol.* **51**, 117–123 (1995).

PITSON S.M., SEVIOUR R.J., MCDOUGALL M.: Purification and characterization of an extracellular β-glucosidase from the filamentous fungus *Acremonium persicinum* and its probable role in β-glucan degradation. *Enzyme Microb.Technol.* **21**, 182–190 (1997).

RASHID M.H., SIDDIQUI K.S.: Purification and characterization of a β-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol.* **42**, 544–550 (1997).

ROSENBERG S.L.: Temperature and pH optima for 21 species of thermophilic and thermotolerant fungi. *Can.J.Microbiol.* **21**, 1535–1540 (1975).

SAHA B., FREER S.N., BOTHAST R.J.: Production, purification and properties of a thermostable β-glucosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Appl.Environm.Microbiol.* **10**, 3774–3780 (1994).

SAHA B.C., FREER S.N., BOTHAST R.J.: Thermostable β-glucosidases, pp. 197–207 in J.N. Saddler, M.H. Penner (Eds): *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates*. American Chemical Society, Washington (DC) 1995.

SENGUPTA S., GHOSH A.K., SENGUPTA S.: Purification and characterization of β-glucosidase enzymes from a mushroom *Termitomyces clypeatus*. *Biochim.Biophys.Acta* **1076**, 215–220 (1991).

STAHMANN K.P., SCHIMZ K.L., SAHM H.: Purification and characterization of four extracellular 1,3-β-glucanases of *Botrytis cinerea*. *J.Gen.Microbiol.* **138**, 2833–2840 (1993).

TONG C.C., COLE A.L., SHEPHERD M.G.: Purification and properties of the cellulases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. *Biochem.J.* **191**, 83–94 (1980).

TRAON-MASSON M.P., PELLERIN P.: Purification and characterization of two β-D-glucosidases from an *Aspergillus niger* enzyme preparation: affinity and specificity toward glucosylated compounds characteristic of the processing of fruits. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 374–382 (1998).

WEI D.L., KIRIMURA K., USAMI S., LIN T.H.: Purification and characterization of an extracellular β-glucosidase from the wood-grown fungus *Xylaria regalis*. *Curr.Microbiol.* **33**, 297–301 (1996).

WOOD T.M., MCCRAE S.I.: Purification and some properties of the extracellular β-D-glucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. *J.Gen.Microbiol.* **128**, 2973–2982 (1982).

WOODWARD J.: Fungal and other β-D-glucosidases – their properties and applications. *Enzyme Microb.Technol.* **4**, 73–79 (1982).

WOODWARD J., ARNOLD S.L.: The inhibition of β-glucosidase activity in *Trichoderma reesei* C-30 cellulase by derivatives and isomers of glucose. *Biotechnol.Bioeng.* **23**, 1553–1562 (1985).

YOSHIDA N., FUKUSHINA T., SAITO H., SHIMOSAKA M., OKAZAKI M.: Cellulose and xylan degrading enzymes of plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* SUB 850. *Agric.Biol.Chem.* **53**, 1829–1836 (1989).

ELSEVIER

Process Biochemistry 37 (2002) 949–954

PROCESS BIOCHEMISTRY

www.elsevier.com/locate/procbio

Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*

E.S. Martins, D. Silva, R. Da Silva, E. Gomes *

Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto-SP, Cristovão Colombo, 2265, CEP 15054-000, Brazil

Received 14 June 2001; received in revised form 4 September 2001; accepted 8 October 2001

Abstract

Pectin lyase (Pl) and polygalacturonase (Pg) production by *Thermoascus aurantiacus* 179-5 was carried out by means of solid-state fermentation using orange bagasse, sugar cane bagasse and wheat bran as a carbon sources. Pg and Pl had optimum activity at pH 5.0 and 10.5–11.0, respectively. Maximal activity of the enzymes were determined at 65 °C. Pg was stable in the acidic to neutral pH range and at 60 °C for 1 h, whereas Pl was stable at acidic pH and at 60 °C for 5 h. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Thermoascus aurantiacus*; Polygalacturonase; Pectin lyase; Thermostable; Thermophilic; Solid-state fermentation

1. Introduction

Interest in thermostable enzymes has increased dramatically in recent years, since their stability and activities at high temperatures have become desirable properties for industrial processing [1]. Thermostable enzymes are generally defined as those with an optimum temperature above that of the maximum for growth of an organism or with exceptional stability above 50 °C over an extended period of time [2].

Enzymes from thermophilic organisms are generally more thermostable, better withstand proteolysis and are more resistant to mechanical denaturation than those produced by mesophiles. In addition to enzymes properties, the fermentation conditions of thermophilic fungi at higher temperatures reduce the risk of contamination by other undesired organisms [3].

Among processes used for enzyme production, solid-state fermentation (SSF) is an attractive one because it presents higher productivity per reactor volume, lower capital and operating costs, lower space requirements, simpler equipment and easier downstream processing compared to that of submerged fermentation (SmF) [4]. In addition, it permits the use of agricultural and agro-industrial residues as substrates which are converted into bulk chemicals and fine products with high commercial value such as alcohol, organic acids, fats, proteins, enzymes, etc. [5–8]. On the other hand, there is evidence that some enzymes are less affected by catabolic repression, are more termostable and their optimum temperature values are higher than those obtained by SmF [9].

Pectic enzymes are used industrially in fruit processing to facilitate pressing and to aid separation of the flocculent precipitate by sedimentation, filtration or centrifugation in the extraction of the clarified juice [10]. These enzymes have been used in other process where the elimination of pectin is essential as in wine making, coffee and tea processing plants and maceration of vegetable tissue [11–13]. The use of SSF for pectinase production has been proposed using different solid agricultural and agro-industrial residues as substrates such as wheat bran [8,14,15], soy bran [16], apple pomace [17,18], cranberry and strawberry pomace [19], beet pulp [6,20], coffee pulp and husk [11,21], cocoa [22], lemon and orange peel [23–27] and sugar cane bagasse [28]. However, in these studies mesophilic microorganisms were used. Studies on SSF with the thermophilic microorganism, *Thermoascus au-*

* Corresponding author. Fax: +55-017-2212390.
E-mail address: eleni@bio.ibilce.unesp.br (E. Gomes).

0032-9592/02/$ - see front matter © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
PII: S0032-9592(01)00300-4

rantiacus, has been carried out monitoring cellulase and hemicellulase production [1,29].

The objectives of this study were polygalacturonase (Pg) and pectin lyase (Pl) production by thermophilic fungi *T. aurantiacus* by SSF and characterization of these enzymes with regard to their thermostability, pH stability and optimum temperature and pH conditions for reaction.

2. Material and methods

2.1. Microorganism

The *T. aurantiacus 179-5* strain used in this study was isolated from decaying hemicellulosic material collected in Amazonas-Brazil. It was maintained on PDA slopes as a stock culture.

2.2. Media, cultivation of microorganism and enzyme production

The solid substrates were prepared as follows:

(a) Orange bagasse: The pellet of orange bagasse (pressed mixture of pulp and peel) was provided by Citrovita agro-industrial Ltda, Catanduva, SP, Brazil. Chemical analysis revealed that the dry material was composed of 11.8% fibre, 6.4% protein, 63% nitrogen, 6.7% ash, 19% total sugar (9% reducing sugar) and 0.1% pectin. The material was ground and particles sieved by a Bender USS 230 strainer and dried at 80 °C.

(b) Sugar cane bagasse: The sugar cane bagasse was provided by Usina de Açúcar e Álcool São Domingos, Catanduva, SP, Brazil. Chemical analysis revealed that the dry material was composed of 75% fibre, 0.5% protein, 5% nitrogen, 3.4% ash and 10.36% total sugar (3.53% reducing sugar). The material was washed in tap water and the same procedure described above was followed.

(c)Wheat bran: This material was obtained commercially, dried and used untreated. Chemical analysis revealed that the dry material was composed of 8.12% fibre, 15.7% protein, 65% nitrogen, 4.57% ash and 16.7% total sugar (5.22% reducing sugar).

SSF was carried out using a 250 ml Erlenmeyer flask containing 5 g of sterilized substrate (120 °C 40 min) inoculated with 10 ml aliquots of micelial suspension (≈ 5 mg dry micelial mass per g dry substrate) which was obtained from a 7-day agar slant culture suspended in sterile Tween 80 solution. After inoculation, 10 ml of nutrient solution, composed of 0.1% NH_4NO_3; 0.1% $NH_4H_2PO_4$; 0.1% $MgSO_4 \times 7H_2O$, was added to each of several flasks. The final moisture content of the medium was approximately 67%.

The mixture of sugar cane bagasse wheat bran was prepared in proportions of 10 and 90%, 30 and 70% and 40 and 60% (w/w). The mixture of sugar cane bagasse orange bagasse was prepared in the same proportions.

Cultivation was carried out at 50 °C for 14 days. At 48 h intervals, the solid fermented material corresponding to one Erlenmeyer flask was mixed with 40 ml distilled water, stirred for 40 min, filtered under vacuum and centrifuged. The supernatant was used as crude enzyme solution.

2.3. Enzyme activity measurements

Pg activity was determined by measuring the release of reducing groups from citrus pectin using a 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent assay. The reaction mixture containing 0.8 ml 1% citric pectin 67% methoxylated (Braspectina) in 0.2 M acetate buffer, pH 5.0 and 0.2 ml of crude enzyme solution, was incubated at 55 °C for 10 min. One unit of enzymic activity (U) was defined as the amount of enzyme which releases 1 μmol of galacturonic acid per minute.

Pl activity was determined by measuring the increase in absorbance at 235 nm of substrate solution (0.8 ml 1% citric pectin in 0.2 M Tris–HCl buffer, pH 8.5) hydrolysed by 0.2 ml enzyme solution, at 55 °C. One unit of U was defined as the amount of enzyme which releases 1 μmol of unsaturated uronide per minute, based on the molar extinction coefficient (5500) of the unsaturated products [30].

Enzyme production was expressed in units per gram of initial dry solid substrate ($U\,g^{-1}$).

2.4. Enzyme characterization

2.4.1. Optimum pH and temperatures for enzyme activity

Enzyme activity was determined at 55 °C, at different pH values using as buffers sodium acetate (pH 3.0–5.0), citrate–phosphate (pH 5.0–7.0), Tris–HCl (pH 7.0–8.5) and glycine–NaOH (pH 8.5–11.0). The optimum temperature was assayed by incubation of the reaction mixture in temperatures at 40–90 °C.

2.4.2. Thermostability

A thin film of mineral oil prevented evaporation of the enzyme solution which was incubated at different temperatures (10–90 °C) for 2 h at pH 5.0. Another experiment was carried out to assay the enzyme stability at 60 °C. The enzyme solution was maintained at this temperature for a period of 8 h. In both assays, an aliquot was withdrawn and placed on ice before assaying for residual pectinase activity at optimum pH and temperature.

2.4.3. pH stability

Crude enzyme was dispersed (1:1) in 0.1 M buffer solutions pH 3.0–5.0 (sodium acetate), pH 5.0–7.0 (citrate–phosphate), pH 7.0–8.5 (Tris–HCl) and pH 8.5–11.0 (glycine–NaOH) and maintained at 25 °C for 24 h. An aliquot was used to determine the remaining activity at the optimum pH and temperature.

3. Results and discussion

3.1. Production of pectinases by solid-state fermentation

The thermophilic fungus *T. aurantiacus*, when grown in a media containing wheat bran, orange bagasse and mixtures of these materials with sugar cane bagasse produced significant quantities of Pg and Pl (Table 1). Enzyme production by SSF was analysed over a period of 14 days. Pg production peaked between the 2nd and 4th days of cultivation for all the media tested, with maximal activity value (43 U g^{-1}) observed when wheat bran or orange bagasse was used. Although a decrease of Pg production can be observed when sugar cane bagasse was added to wheat bran and to orange bagasse, this result was not statistically significant.

Pl production was observed after the 4th day of fermentation and the peak occurred between the 8th and 10th days. The medium containing orange bagasse afforded higher Pl production compared to those with wheat bran (Table 1). However, the highest yields of Pl activity were obtained with the addition of sugar cane bagasse to orange bagasse media (10, 30 and 40% of sugar cane bagasse w/w). Maximal value of Pl activity (40 180 U g^{-1}) was obtained in a medium composed of 10% sugar cane and 90% of orange bagasse.

The consistency and size of particle of media composed of wheat bran and orange bagasse could withstand a change in the packing of the substrate particle during the fermentation, since the bed remained static, playing a role in affecting heat and mass transfer within the system [31].The addition of fibrous material such as sugar cane bagasse, resulted in interparticle spacing with a possible increase in the aeration and nutrient and enzyme diffusion supporting Pl production.

The effect of different carbon sources on pectinase synthesis by fungi in submerged and SSF was studied. It is generally agreed that the optimum medium for the enhanced production of extracellular pectinase is that containing pectic materials as an inducer [18,32–34]. The present results indicated that there was not much effect on Pg production by media composition. On the other hand, media containing pectin, such as orange bagasse, enhanced Pl activity.

The quantities of Pg and Pl obtained in the present study were high compared to those reported for pectinolytic strains such as *Aspergillus niger* (25 U Pg and 350 U Pl per g of substrate), *Penicillium italicum* (6 U Pl per g e 25 U Pg per g), *Penicillium frequentans* (3.4 U Pg per g) and *Aspergillus foedidus* (1000 U Pl per g) cultivated on solid substrates [8,16,17,23]. However, the comparison of enzyme levels produced by different organisms is not straightforward since distinct culture conditions were used.

The comparison between Pg and Pl production during growth of *T. aurantiacus* suggests a sequential induction of these enzymes. Sequential production of pectinases have been reported by various authors [13,35–37]. According to Hours et al. [17], *A. foedidus* grown in apple pulp produced maximal Pg and Pl activities after 48 and 96 h, respectively. Other hemicellulolytic enzymes presented similar profiles [26].

These results indicate that orange bagasse is suitable for pectinase production by *T. aurantiacus* and that SSF may be achieved using this agro-industrial residue. The above results could be useful for the large-scale

Table 1
Pectinase production by *T. aurantiacus* on FSS

Substrate	Polygalacturonase		Pectin lyase	
	Maximal production (U g^{-1})	Cultivation day	Maximal production (U g^{-1})	Cultivation day
Wheat bran	43	4	11 600	14
Orange bagasse	43	6	19 320	12
10% sugar cane bagasse and 90% wheat bran	34	4	14 680	10
30% sugar cane bagasse and 70% wheat bran	37	4	14 600	6
40% sugar cane bagasse and 60% wheat bran	27	4	10 040	8
10% sugar cane bagasse and 90% orange bagasse	32	6	40 180	8
30% sugar cane bagasse and 70% orange bagass	40	4	32 000	10
40% sugar cane bagasse and 60% orange bagase	37	4	29 360	10

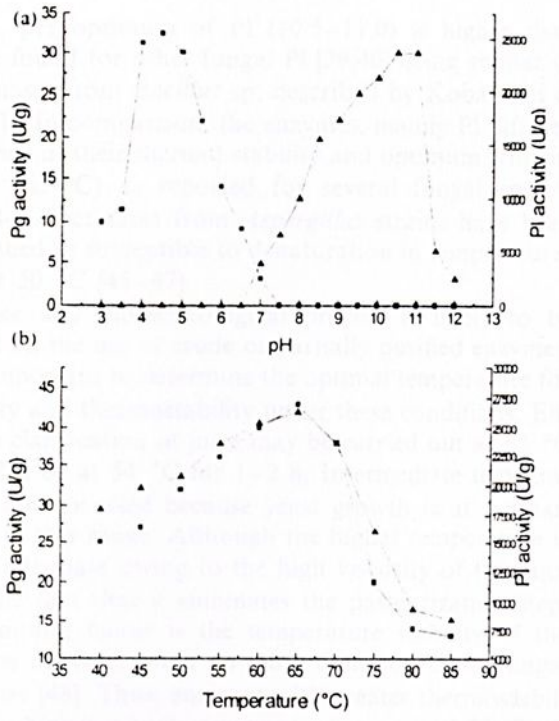


Fig. 1. Effect of pH and temperature on the activity of pectinases by *T. aurantiacus* in SSF. For pH assay, the enzyme activity was determined at 60 °C. For temperature assay, the residual activities of Pl and Pg were assayed at pH 10.0 and 5.0, respectively ■ = Polygalacturonase; ▲ = pectin lyase.

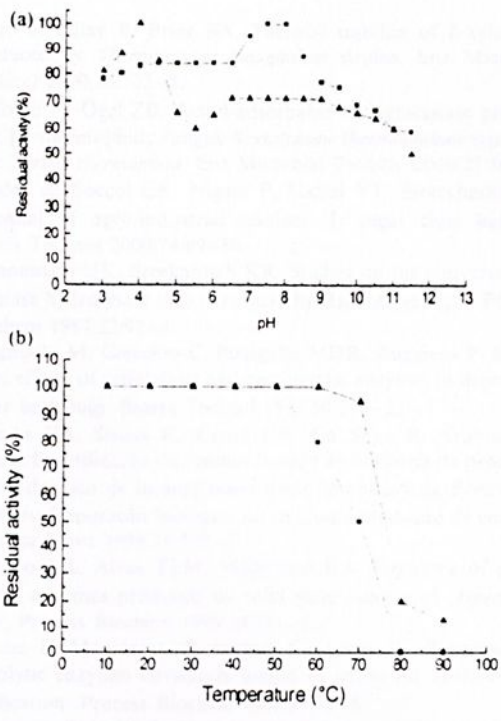


Fig. 2. Stability of the Pl and Pg produced by *T. aurantiacus* against pH and temperature. Remaining activity was assayed at the optimum pH and temperature for enzymes. ■ = Polygalacturonase; ▲ = pectin lyase.

production of these enzymes in bioreactors for thermophilic microorganism, as proposed by Kalogeris et al. [1]. Lignocellulosic materials such as wheat bran, sugar beet pulp and arundo cane have used as carbon sources for *T. aurantiacus* cultivation and depolymerizing enzyme production [28,38].

Although there are ample possibilities for improving enzyme production by optimising fermentation conditions, it was not within the scope of this study and additional studies are required.

3.2. Enzyme characterization

Characterization of the Pg and Pl activities in the crude enzyme solution obtained from *T. aurantiacus* cultivation for 6 and 8 days, respectively, in media composed of 10% sugar cane bagasse and 90% orange bagasse was carried out. Pg exhibited maximal activity at pH 5.0 and Pl at pH 10.5–11.0 (Fig. 1a). The optimum temperature for both enzymes was determined to be 65 °C, and they retained 88% of maximum activity at 70 °C (Fig. 1b).

As illustrated in Fig. 2a, Pg was stable at pH values of 7.0–8.0 and maintained 85% of its activity at pH 4.0–6.5. Pl was more sensitive to pH variation, presenting maximum stability at pH 4, which declined to 80% at pH 3 and to 65% at pH 5.0.

When maintained at 60 °C for 2 h, the retained activities of Pg and Pl were 100 and 80%, respectively. At 70 °C for 2 h, 95% of original Pl activity was retained, whereas the same conditions of incubation reduced Pg activity by 50% (Fig. 2b).

After incubation at 60 °C for 8 h, 37% of Pl activity was lost while only low levels of Pg activity (≈ 30%) were detected after 4 h of incubation at this temperature (Fig. 3).

The low pH (5.0) optimum found for Pg is comparable to those from other fungal strains. On the other

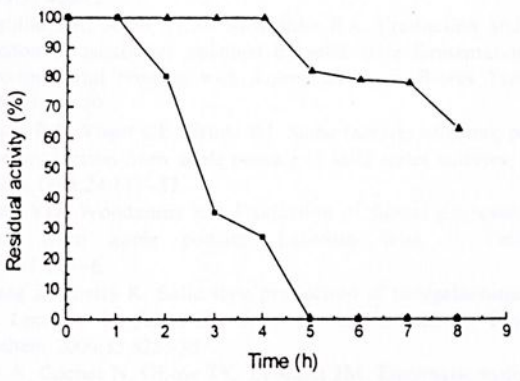


Fig. 3. Stability of the Pl and Pg produced by *T. aurantiacus*, at 60 °C. The crude enzyme was maintained at 60 °C, at pH 5.0. An aliquot was assayed for the remaining activity at optimum pH and temperature for enzymes. ■ = Polygalacturonase; ▲ = pectin lyase.

hand, pH optimum of Pl (10.5–11.0) is higher than those found for other fungal Pl [39,40] being similar to pectinases from *Bacillus* sp. described by Kobayashi et al. [41]. In comparison, the enzymes, mainly Pl differed in terms of their thermal stability and optimum temperature (65 °C) as reported for several fungal species [42–44]. Pectinases from *Aspergillus* strains have been described as susceptible to denaturation in temperatures above 50 °C [45–47].

Since any biotechnological process is likely to be based on the use of crude or partially purified enzymes, it is important to determine the optimal temperature for activity and thermostability under these conditions. Enzymic clarification of juice may be carried out at 15 °C for 12 h or at 54 °C for 1–2 h. Intermediate temperatures are not used because yeast growth is at a maximum in this range. Although the higher temperature is more adequate owing to the high viscosity of the juice and the fact that it eliminates the pasteurization step, the limiting factor is the temperature stability of the enzyme mixture, often no more than 50 °C for fungal enzymes [48]. Thus, enzymes with greater thermostability and higher activity temperatures are required. Optimum activity and high stability at elevated temperatures can prevent the undesirable growth of mesophylic contaminants in industrial applications.

4. Conclusions

The present study indicates that it is feasible to use agro-industrial residues for Pg and Pl production by newly isolated thermophilic *T. aurantiacus*. This fungus is able to produce high levels of extracellular Pl during the SSF of mixtures of sugar cane and orange bagasses.

Pectinases produced from *T. aurantiacus* have a high optimum temperature (65 °C) with good thermostability, especially Pl which was stable for 5 h at 60 °C. These results offer an attractive alternative source of enzymes for industrial supply use in juice production of thermostable and thermophilic pectinases.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support and Dr Rosely Ana Piccolo Grandi (Seção de Micologia e Liquenologia/Instituto de Botânica/São Paulo) for identification of the fungus.

References

[1] Kalogeris E, Fountoukides D, Kekos D, Macris BJ. Design of a solid-state bioreactor for thermophilic microorganisms. Biores Technol 1999;67:313–5.

[2] Singh S, Pillay B, Prior BA. Thermal stability of β-xylanases produced by *Thermomyces lanuginosus* strains. Enz Microbial Technol 2000;26:502–8.

[3] Arifoglu N, Ögel ZB. Avicel-adsorbable endoglucanase production by thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* type culture *Torula thermophila*. Enz Microbial Technol 2000;27:560–9.

[4] Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugar cane bagasse. Biores Technol 2000;74:69–80.

[5] Manonmani HK, Sreekantiah KR. Studies on the conversion of cellulase hydrolysate into citric acid by *Aspergillus niger*. Process Biochem 1987;22:92–4.

[6] Spagnuolo M, Crecchio C, Pizzigallo MDR, Ruggiero P. Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp. Biores Technol 1997;60:215–22.

[7] Tavares VB, Sivieri K, Ceron CR, Da Silva R, Trabuco E, Gomes E. Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: Depuração biológica do resíduo e produção de enzima. Química Nova 1998;21:722–5.

[8] Castilho LR, Alves TLM, Medronho RA. Recovery of pectinolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. Process Biochem 1999;34:181–6.

[9] Lozano P, Manjón A, Romojaro F, Iborra JL. Properties of pectolytic enzymes covalently bound to nylon for apricot juice clarification. Process Biochem 1988;23:75–8.

[10] Rombouts FM, Pilnik W. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. Process Biochem 1978;18:9–13.

[11] Boccas F, Roussos S, Gutierrez M, Serrano L, Viniegra GG. Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. J Food Sci Technol 1994;31:22–6.

[12] Da Silva R, Franco CML, Gomes E. Pectinases, hemicelulases e celulases: ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: Revisão. Bol Soc Bras Ciên Tecnol Alim 1997;31:249–60.

[13] Acunã-Argüelles ME, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-Ginzález G, Favela-Torres E. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. Appl Microbiol Biotechnol 1995;43:808–14.

[14] Soares MMCN, Da Silva R, Gomes E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity characterization of the Pgase produced by *Bacillus species*. Rev Microbiol 1999;30:229–303.

[15] Singh SA, Plattner H, Diekmann H. Exopolygalacturonate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp. Enz Microb Technol 1999;25:420–5.

[16] Castilho LR, Alves TLM, Medronho RA. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. Biores Technol 2000;71:45–50.

[17] Hours RA, Voget CE, Ertola RJ. Some factores affecting pectinase production from apple pomace in solid states cultures. Biol wastes 1988;24:147–57.

[18] Hang YD, Woodanms EE. Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. Lebensm Wiss U Technol 1994;27:194–6.

[19] Zheng Z, Shetty K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. Process Biochem 2000;35:825–30.

[20] Sidi A, Cochet N, Ghose TK, Lebeault JM. Enzymatic hydrolysis of sugar beet pulp. Biotechnol Le't 1984;6:723–8.

[21] Antier P, Minjares A, Roussos S, Raimbault M, Viniegra G. Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid state fermentation of coffee pulp. Enz Microb Technol 1993;15:254–60.

[22] Schwan RF, Cooper RM, Wheals AE. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. Enz Microb Technol 1997;21:234–44.

[23] Garzón CG, Hours RA. Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. Biores Technol 1992;39:93–5.

[24] Fonseca MJV, Said S. The pectinase produced by *Tubercularia vulgaris* in submerged culture using pectin or orange-pulp pellets as inducer. Appl Microbiol Biotechnol 1994;42:32–5.

[25] Larios G, Garcia JM, Huitron M. Endo-polygacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus* sp. ch-y-1043. Biotechnol Lett 1989;11:729–34.

[26] Maldonado MC, Navarro A, Callieri DAS. Production of pectinases by *Aspergillus* sp. using differently pretreated lemon peel as the carbon source. Biotechnol Lett 1986;8:501–4.

[27] Ismail AS. Utilization of orange peels for the production of multi-enzyme complexes by some fungal strains. Process Biochem 1996;1:645–50.

[28] Acuña-Argüelles ME, Gutiérrez-Rojas M, Viniegra-Gonzáles G, Favela-Torres E. Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. Biotechnol Lett 1994;16:23–8.

[29] Kalogeris E, Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: characterization of two enzymes. J Biotechnol 1998;60:163–5.

[30] Albersheim P. Pectin lyase from fungi. Meth Enzymol 1966;8:628–31.

[31] Mitchell DA, Krieger N, Stuart DM, Pandey A. New developments in solid-state fermentation. II. Rotational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. Process Biochem 2000;35:1211–25.

[32] Solis-Pereira S, Favela Torres E, Viniegra-Gonzales G, Gutierrz-Rojas M. Effect of different carbons sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. Appl Microbiol Biotechnol 1993;39:36–41.

[33] Naidu GSN, Panda T. Production of pectolytic enzymes—a review. Process Eng 1998;19:355–61.

[34] Galiatou-Panayotou M, Rodis P, Kapantai M. Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRR1-364 grown on supplemnted citrus pectin. Lett Appl Microbiol 1993;17:145–8.

[35] Hugouveiex-Cotte-Pattal N, Condemine G, Nasser W, Reverchon S. Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. Rev Microbiol 1996;50:213–57.

[36] Fonseca MJV, Said S. Sequential production of pectinases by *Penicillium frequentans*. World J Microbiol Biotechnol 1995;11:174–7.

[37] Leone G, Heuvel J, Van Den Heuvel J. Regulation by carbohydrates of the sequential in vitro production of pectic enzymes by *Botrytis cinerea*. Can J Bot 1987;65:2133–41.

[38] Roche N, Durand A. Kinetics of *Thermoascus aurantiacus* solid-state fermentation on sugar-beet pulp—polysaccharide alteration and production of related enzymatic activities. Appl Microbiol Biotechnol 1996;45:584–8.

[39] Whitaker JR. In: Fogarty WM, Kelly CT, editors. Microbial enzymes and biotechnology. London: Elsevier, 1990:133–76.

[40] Rombouts FM, Pilnik W. In: Pilnik W, editor. Microbiology enzymes and bioconversion. London: Academic Press, 1990:227–81.

[41] Kobayashi T, Hatada Y, Higaki N, Lusterio DD, Ozawa T, Koike K, et al. Enzymatic properties and deduced amino acid sequence of a high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate. Bioch Biophys Acta 1999;1427:145–54.

[42] Riou C, Freyssinet G, Feure M. Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. Appl Env Microbiol 1992;58:578–83.

[43] Ryazanova LP, Mikhaleva NI, Solov'eva IV, Boev AV, Okunev ON, Kulaev IS. Pectolytic enzymes from *Aspergillus heteromorphus*. Appl Biochem Microbiol 1996;32:1–6.

[44] Blanco P, Sieiro C, Villa TG. Production of pectic enzymes in yeasts. FEMS Microbiol Lett 1999;175:1–9.

[45] Galiotou-Panayotou M, Kapantai M, Kalantzi O. Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production. Appl Microbiol Biotechnol 1997;47:425–9.

[46] Bailey MJ, Pessa E. Strain and process for production of polygalacturonase. Enz Microb Technol 1990;12:266–71.

[47] Ueda S, Yusaku F, Lim JY. Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus* orysae A-3. J Appl Biochem 1982;4:524–32.

[48] Lea AGH. In: Tucker GA, Woods LFJ, editors. Enzymes in food processing. Glasgow: Backie Academic and Professional, 1998:223–47.

Copyright © 2003 by Humana Press Inc.
All rights of any nature whatsoever reserved.
0273-2289/03/105-108/0393/$20.00

Effect of *Bacillus circulans* D1 Thermostable Xylanase on Biobleaching of Eucalyptus Kraft Pulp

DANIELA A. BOCCHINI, VALQUIRIA B. DAMIANO, ELENI GOMES, AND ROBERTO DA SILVA*

Departmento de Quimica de Geociencias, Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada, IBILCE—UNESP, Rua Cristovão Colombo 2265, São José do Rio Preto, SP, CEP 15054-000, Brazil, E-mail: dasilva@qeg.ibilce.unesp.br

Abstract

The alkalophilic *Bacillus circulans* D1 was isolated from decayed wood It produced high levels of extracellular cellulase-free xylanase. The enzyme was thermally stable up to 60°C, with an optimal hydrolysis temperature of 70°C. It was stable over a wide pH range (5.5—10.5), with an optimum pH at 5.5 and 80% of its activity at pH 9.0. This cellulase-free xylanase preparation was used to biobleach kraft pulp. Enzymatic treatment of kraft pulp decreased chlorine dioxide use by 23 and 37% to obtain the same kappa number (κ number) and brightness, respectively. Separation on Sephadex G-50 isolated three fractions with xylanase activity with distinct molecular weights.

Index Entries: *Bacillus circulans*; biobleaching; kraft pulp; thermophilic; xylanase.

Introduction

After cellulose, hemicelluloses are the most abundant organic materials found on Earth and are the main polysaccharides of plant cell walls. They are closely associated with cellulose in plant tissues and account for 40–45% of the dry weight of hardwood and softwood. Xylan is the main constituent of hemicellulose from wood, and it accounts for >90% of the hemicellulose in kraft pulp from hardwood, and about 50% of hemicelluloses in softwood pulps (*1*). There is evidence that xylan binds to lignin by

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

covalent bonds, and that hydrogen bonds and Van der Wall's forces bind xylan to the cellulose chain (2).

In recent years, there has been increasing interest in applying xylanolytic enzymes, mainly endoxylanases, to the pulp bleaching process. After cooking wood chips under alkaline conditions (kraft process), about 90% of lignin is removed and about 10% remains, encrusting the cellulose and hemicellulose fractions. Traditional bleaching using chlorine-based compounds effectively removes residual lignin, but it is very harmful to the environment. Many researchers are investigating environmentally clean bleaching processes using chemical or biotechnological approaches (3,4). The efficacy of xylanase in biobleaching has been demonstrated in many scientific reports. These reports conclude that xylanase depolymerizes xylan, opening the polymeric cellulose-hemicellulose-lignin matrix, releasing lignin-bound fragments, and facilitating the chemical removal of lignin during bleaching (4). In addition, these enzymes improve paper qualities, such as brightness and viscosity (5–9). Over the last decade, a number of microbial enzymes have been assessed for potential application in the paper and pulp industry (3–30). Bleaching occurs under high temperature and alkalinity and the enzymes must tolerate these conditions.

Bacillus circulans D1, an alkalophilic and thermophilic bacterial strain, was isolated in our laboratory, from decayed wood. It shows high xylanase production. The crude xylanase produced by this microorganism is thermostable and cellulase free. Our goal was to employ the crude xylanase produced by *B. circulans* D1 as a booster in chlorine-based biobleaching of *Eucalyptus* kraft pulp, and to analyze its effectiveness on reducing chlorine consumption.

Materials and Methods

Media and Screening of Microorganisms

Nutrient medium was prepared as described by Horikoshi (31), containing xylan (10 g/L), beef extract (10 g/L), peptone (10 g/L), NaCl (10 g/L), and KH_2PO_4 (1 g/L), and Na_2CO_3 (5 g/L) (separately sterilized). For the solid nutrient medium, 15 g/L of agar was added. To screen for xylanolytic and alkalophilic microorganisms, the nutrient medium was used with dried corn straw strips, as a carbon source replacing xylan. The corn straw strips were placed vertically into tubes containing nutrient medium. Samples of soil, agricultural wastes, and decayed wood were collected (approx 0.5 g of each sample) and put into flasks containing 1.5 mL of nutrient medium. In the laboratory, these samples were transferred to tubes containing screening medium and incubated at 50°C for 120 h. After incubation, 1.0 mL of the contents from the tubes, with degraded straws trips, was diluted in 5.0 mL of sterile distilled water and one loop was inoculated on plates containing solid nutrient medium. The plates were maintained at 50°C, and then the developed colonies were transferred to slant tubes with solid nutrient medium.

Microorganism and Growth Conditions

B. circulans D1 was isolated from decaying wood and was identified by Fundacao Andre Tosello, Campinas, SP, Brazil. For enzyme production, the *B. circulans* D1 was grown in alkaline medium (pH 9.0) except using 2% corn straw, powdered to a diameter of 1.0 mm, as the carbon source. Twenty milliliters of the medium, in 125-mL Erlenmeyer flasks, was inoculated with 10^7 cells/mL and incubated at 45°C with shaking at 150 rpm. After 48 h, the bacteria were harvested by centrifuging at 12,000*g* at 4°C for 20 min. The cell-free solution was used as crude enzyme solution.

Determination of the enzymatic activity

Enzyme activity was expressed in international units (IU). Xylanase (1,4-β-D-xylan xylanhydrolase, EC 3.2.1.8) activity, carboxymethyl cellulase (endo-1,4-β-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.4), and Avicelase (exo-1,4-β-D-cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91) were assayed by incubating 0.1 mL of appropriately diluted enzyme with 0.9 mL of a solution containing 0.5% of the respective substrate (xylan [Birchwood; Sigma, St. Louis, MO], carboxymethyl cellulose [C5678; Sigma], and avicel [Merck]) in 0.1 *M* acetate buffer, pH 5.5. After incubating at 60°C for 10 min, the reducing substances released were assayed by dinitrosalicylic acid as described by Miller *(13)*. Controls were prepared with enzyme added after boiling. The definition of 1 IU of activity toward the substrate just mentioned was 1 µmol of xylose or glucose equivalent released/min under the stated assay conditions, by using a xylose or glucose standard curve.

Effect of Temperature and pH on Xylanase Activity and Stability

Xylanase activity was measured between 45 and 80°C. Thermal stability (without substrate) was also estimated by maintaining the enzyme for 1 h at the same temperatures. After cooling, the residual activities were estimated under the standard condition. The effect of pH on xylanase activity was tested from 3.5 to 10.5. pH stability (without substrate) was estimated by maintaining the enzymes for 24 h in the same pH range and then determining the residual activities under the standard condition.

Fractionation of Xylanase

The crude enzyme was precipitated by adding ethanol to make a 70% (v/v) solution; the precipitate was collected by centrifugation. The concentrated crude enzyme (12 mL), containing a total of 601 IU, was applied to a Sephadex G-50 column that had been equilibrated with 20 m*M* acetate buffer, pH 5.0, and was eluted with the same buffer.

Products of Xylan Hydrolysis

Birchwood xylan hydrolysates were examined by descending paper chromatography, as described by Trevelyn et al. *(32)*.

Enzymatic Treatment of Pulp

Eucalyptus kraft pulp was courteously donated by Champion Paper and Cellulose from Mogi Guaçu, SP, Brazil. It had an initial κ number (milliliters of 0.1 *N* potassium permanganate consumed by 1 g of dry wood chemical pulp under specific conditions) of 13.85 and brightness of 37.0 ISO. The unbleached pulp was washed twice with distilled water to remove residual brown liquor. Crude enzyme was applied to the pulp at a concentration of 13.5 IU/g of dried pulp. The enzymatic treatment was made in plastic bags at a slurry concentration of 10%. The pH of this mixture was adjusted to 5.5 by adding glacial acetic acid, and then the mixture was homogenized and the plastic bags were maintained at 60°C for 4 h. Then, the plastic bags were cooled in cold water for a few minutes, and the pulp was washed twice with distilled water and filtered in a Buchner funnel.

Chemical Bleaching

Pulps, treated and untreated with enzyme, were bleached with chlorine dioxide (ClO_2) followed by extraction with NaOH(E) (DE bleaching stages). The amount of ClO_2 used in the bleaching was determined by calculating the concentration of active chlorine on the aqueous solution of ClO_2 and varied around the kappa (κ) factor recommended (κ factor is a standard quantity, determined experimentally, used in studies comparing bleaching processes and represents the percentage of active chlorine divided by the κ number of the pulp: κ number × κ factor = % of ClO_2), which under typical industrial conditions is 0.26. The samples contained 10.0 g of oven-dried pulp and ClO_2, at a 10% slurry concentration. Each sample was homogenized, maintained in a bath at 60°C for exactly 30 min, cooled, and then washed with distilled water in a Büchner funnel. The alkaline extraction was made with pulp at 10% concentration, at 70°C for 1 h and NaOH final concentration of 1.6%. Afterward, the samples were washed with distilled water and filtered in a Buchner funnel.

Pulp Properties

Pulp properties were investigated according to the Standard Methods of the Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI Standard Methods). For determination of κ number, the microKappa methodology was used, by reacting pulp samples with acidified potassium permanganate, as described in TAPPI protocol T-236 OM-85. After deligнification, the pulp was pressed and transformed in dried sheets, at room temperature, for viscosity and brightness experiments. Viscosity was evaluated by dissolving pulps in cupriethylenodiamine and by measuring the viscosity with an Ostwald viscosimeter, as described in TAPPI protocol T-230 OM-82. The brightness of the paper sheets was measured by reflectance at 457 nm with an Elrepho 2000 instrument, according to TAPPI protocol T-452 OM-87.

Table 1
Characteristics of Treated and Untreated Kraft Pulp

	Untreated pulp			Pulp treated with xylanase		
	κ number	Brightness (ISO)	Viscosity (cP)	κ number	Brightness (ISO)	Viscosity (cP)
Before bleaching	13.85	37.00	60	12.80	41.00	61.5
After bleaching	2.70	56.50	32	1.70	60.00	35

Pulps were submitted to bleaching under typical conditions: κ factor of 0.26 (0.36 g of ClO_2/10 g dry wt pulp) and 1.6% NaOH extraction.

Results and Discussion

Properties of Crude Xylanase

The crude enzyme solution was analyzed for cellulase activity, but it was free of this enzyme. The optimum pH and temperature for xylanase activity were 5.5 and 70°C, respectively. The thermal stability of the crude enzyme was measured, in the absence of substrate, from 20 to 80°C for 1 h. This enzyme loses activity when incubated above 60°C. The crude xylanase was stable in the pH range of 5.5–10.5 after incubating in different buffers for 24 h. These values agree with those reported for xylanases produced by other *Bacillus* strains (23–25).

Effect of Enzymatic Treatment and Chemical Bleaching on Pulp

Table 1 shows the results from enzymatically treating and bleaching with ClO_2. The initial k number of the pulp was 13.85, and it was reduced after enzymatic treatment to 12.80. In addition to this reduction in k number, pulp brightness increased by about 4 U.

The pulps, treated and untreated with xylanase, were submitted to DE bleaching sequence, with varying ClO_2 concentrations. For xylanase treatment, investigators have used only one ClO_2 concentration, but the chlorine concentration used after enzyme treatment may influence the results. To analyze this point, bleaching was performed with different ClO_2 concentrations. As shown in Fig. 1, the κ number of the pulp treated with xylanase decreased quickly (from 3.5 to 1.7) until it reached the value of 1.70 IU (0.36 g of ClO_2), and then it slowed down, tending to stabilize at about 1.0–1.5 IU. From this result we can suppose that there is a ClO_2 concentration at which the majority of the delignification reaction occurs and that an additional increase in chlorine concentration will not significantly decrease κ number. This reaction occurs probably because there are few xylan-lignin associations at this stage of κ number. In our study, according to Table 1 and Fig. 1, at a κ factor of 0.26 (0.36 g of ClO_2), the range of delignification was 80 (13.5–2.70) and 88% (13.5–1.7) for untreated pulp and enzyme-treated pulp, respectively. This is important in order to reduce

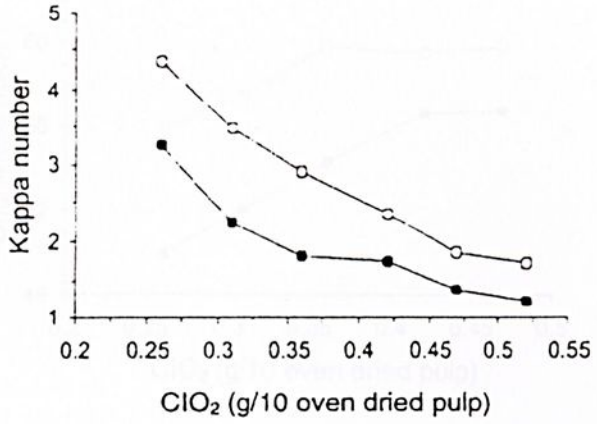


Fig. 1. κ Number of kraft pulp (—●—) treated and (—○—) untreated with xylanase from *B. circulans* D1. Data are mean of two replicates.

the bleaching process cost and discharge of chlorinated organic compounds. The enzymatic treatment of pulp resulted in significant chlorine savings. If we consider, e.g., the κ number of 2.7, this number was already obtained with a κ factor of 0.17 (0.23 g of ClO_2/10 g of dried pulp) in the pulp treated with enzyme. To reach this value in the untreated pulp, it was necessary to employ a κ factor of 0.22 (0.3 g of ClO_2/10 g of dried pulp). The enzyme decreased by 23% the amount of ClO_2 used for pulp delignification. Many scientific articles have reported a decrease in the active chlorine rate in relation to the κ number, varying from 20 to 40% *(12)*.

Enzymatic treatment of the pulp increased brightness by approx 4 IU compared to untreated pulp (Fig. 2). The results indicate that for a given brightness, e.g., 56.5, a κ factor of 0.25 (0.35 g of ClO_2/10 g of dried pulp) would be needed for the untreated pulp, compared with 0.16 (0.22 g of ClO_2/10 g of dried pulp) in the pulp treated with xylanase. This is 37% less ClO_2 used to reach the same brightness. Using xylanase from *Streptomyces thermoviolaceus* in the biobleaching of kraft pulp, Garg et al. *(22)* observed a 30–35% saving in the chlorine required to obtain pulp brightness, comparable with the control. Using xylanase of *B. circulans* AB 16 in biobleaching of eucalyptus pulp, Dhillon et al. *(8)* reduced chlorine consumption by 20% to achieve the same final pulp brightness compared with the control.

The pulp treated with enzyme had more viscosity than the untreated pulp. This was likely owing to the selective enzymatic hydrolysis of low molecular weight pulp xylans that probably contributed to a smaller average viscosity *(8,20)*. This parameter indicates that the crude enzyme did not disrupt fiber, and thus loss of paper properties *(8,10)*. A slight increase in viscosity was also obtained by Dhillon et al. *(8)* using xylanase from *B. circulans* AB 16, and by Buchert et al. *(21)* using xylanase from *Trichoderma reesei*. Viscosity reduction is not desirable because this property is related to the degree of cellulose polymerization and to paper strength

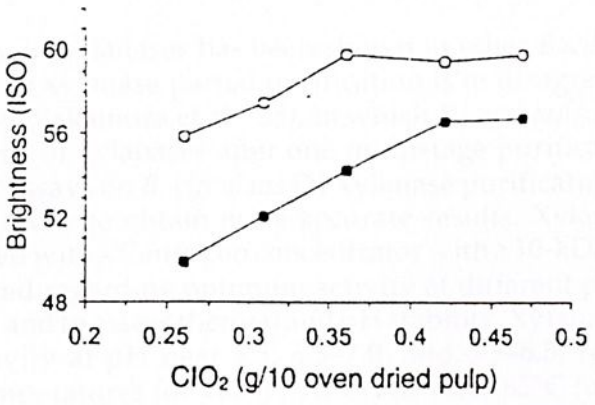


Fig. 2. Brightness of kraft pulp (—○—) treated and (—●—) untreated with xylanase from *B. circulans* D1. Data are mean of seven replicates.

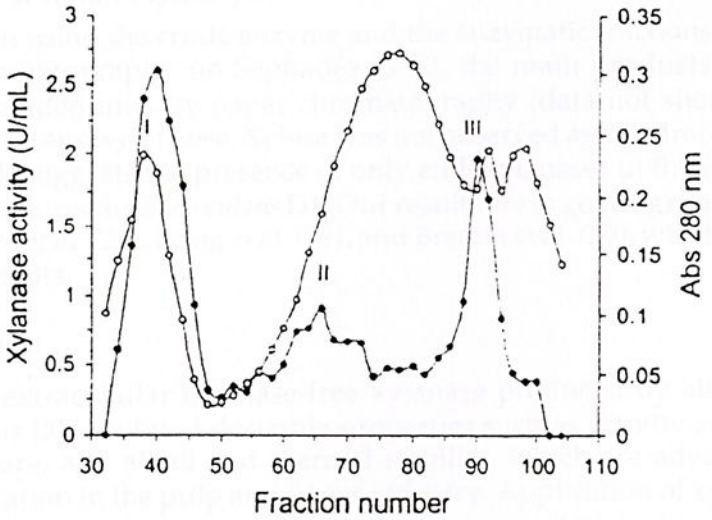


Fig. 3. Fractioning of *B. circulans* D1 xylanase on Sephadex G-50. (—●—) Xylanase activity; (—○—) 280-nm absorbance.

Fractions of Xylanases on Crude Enzymatic Extract

The crude precipitated enzyme was applied to a Sephadex G-50 column to separate it from pigments and other enzymes present in the crude enzymatic extract. The column separated the crude enzyme into three xylanase fractions (Fig. 3) designated xylanases I, II, and III, representing distinct molecular weights of enzymes. Silva et al. *(26)* cited gel filtration as an initial step of xylanase purification. Khanna et al. *(27)* also used Sephadex G-50, and elution of the xylanase resulted in one peak of xylanase activity.

Multiplicity in xylanases has been shown in other *Bacillus* species *(28)*. Our result on xylanase partial purification is in disagreement with that observed by Nakamura et al. *(28)*, in which *B. circulans* AB 16 displayed two isoforms of xylanases after one multistage purification procedure. Additional assays on *B. circulans* D1 xylanase purification are being performed in order to obtain more accurate results. Xylanases I–III were concentrated with a Centricon concentrator with a 10-kDa cutoff and then characterized regarding optimum activity at different pH and temperature values and to assess thermal and pH stability. Xylanases I–III showed higher activity at pH near 5.5, 6.5–7.0, and 5.5–6.5, respectively. The optimal temperatures for xylan hydrolysis were 65°C for xylanase I and III and about 65–70°C for xylanase II. At 80°C, >67% of the activity of xylanase III was retained, whereas at the same temperature, the remaining activities of xylanases I and II were about 37 and 44%, respectively.

Products of Xylan Hydrolysis

When using the crude enzyme and the enzymatic fractions collected after chromatography on Sephadex G-50, the main products of xylan hydrolysis identified by paper chromatography (data not shown) were xylotetraose and xylotriose. Xylose was not observed as a hydrolysis product, which suggests the presence of only endoxylanases in the enzymatic extract produced by *B. circulans* D1. Our results are in good agreement with Nakamura et al. *(28)*, Kang et al. *(29)*, and Breccia et al. *(30)*, who have cited similar results.

Conclusion

The extracellular cellulase-free xylanase produced by alkalophilic *B. circulans* D1 exhibited desirable properties such as activity at elevated temperature, and alkali and thermal stability, which are advantageous for application in the pulp and paper industry. Application of xylanase to the kraft pulp significantly reduced the requirement of oxidizing ClO_2 in the bleaching process. The crude xylanase displayed action of endoxylanase and was separated in three fractions of distinct molecular weight.

Acknowledgments

We gratefully thank Champion Paper and Cellulose Ltda for providing the pulp samples, Dr. Jorge L. Colodette for the analytical tests of pulp samples, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo for financial support.

References

1. Eriksen, O., Goring, D. A. I., and Lindgren, B. O. (1980), *Wood Sci. Technol.* **14**, 267–279.
2. Ferreira Filho, E. X. (1994), *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**, 1093–1109.
3. Tavares, V.B., Gomes, E., Iembo, T., Bocchini, D. A., and Da Silva, R. (1997), in *Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and other Wood Components*, pp. 367–371.

4. Chen C. C., Adolphson, R., Dean, J. F. D., Eriksson, K. E., Adams, M. W. W., and Westpheling, J. (1997), *Enzyme Microb. Technol.* **20**, 39–45.
5. Tolan, J. J. and Canovas, R. V. (1992), *Pulp Paper Can.* **93**, 39–42.
6. Viikari, L., Buchert, J., Tenkanen, M., and Kantelinen, A. (1995), *Bioresour. Technol.* **50**, 65–72.
7. Beg, Q. K., Bhushan, B., Kapoor, M., and Hoondal, G. S. (2000), *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 459–466.
8. Dhillon, A., Gupta, J. K., Jauhari, B. M., and Khanna, S. (2000), *Bioresour. Technol.* **73**, 273–277.
9. Antonopoulos, V. T., Hernadez, M., Arias, M. E., Mavrakos, E., and Ball, A.S. (2001), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 92–97.
10. Da Silva, R. Yim, D. K. Park, Y. K. (1994) *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 109–111.
11. Kulkarni, N., Abhay, S., and Rao, M. (1999), *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 411–456.
12. Tolan, J. J. and Canovas, R. V. (1992), *Pulp Paper Can.* **93**, 39–42.
13. Wong, K. K. L, Tan, L. U. L, and Sadler, J. N. (1988), *Microbiol. Rev.* **52**, 305–317.
14. Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Sundquist, J., and Linko, M. (eds.) (1986), *Proceedings of the 3rd International Conference on Biotechnology Pulp and Paper Industry*, Stockholm, Sweden, pp. 67–69.
15. Eligir, G., Sykes, M., and Jeffries, T. W. (1995), *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 954–959.
16. Patel, R. N., Grabski, A. C., and Jeffries, T. W. (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 405–412.
17. Tavares, V. B., Gomes, E., and Da Silva, R. J. (1997), *Brazilian Soc. Microbiol.* **28**, 179–182.
18. Senior, D. J., Meyers, P. R., Miller, D., Sutclije, R., Tan, L., and Saddler, J. N. (1988), *Biotechnol. Lett.* **10**, 907–912.
19. Yang, V. W., Zhaung, Z., Elegir, G., and Jeffries, T. W. J. (1995), *Indust. Microb.* **15**, 434–441.
20. Paice, M. G., Bernier, R., Jr. and Jurasek, L. (1988), *Biotechnol. Bioeng.* **32**, 235–239.
21. Buchert, J., Ranua, M., Kantelinen, A., and Viikari, L. (1992), *Appl. Microb. Biotechnol.* **37**, 825–829.
22. Garg, A. P., Roberts, J. C., and McCarthy, A. J. (1998), *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 594–598.
23. Harris, G. W., Pickersgill, R. W., Connerton, I., Debeire, P., Touzel, J. P., Breton, C., and Pérez, S.(1997), *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **29**, 77–86.
24. Lopez, C., Blanco, A., and Pastor, F. I. J. (1998), *Biotechnol. Lett.* **20(3)**, 243–246.
25. Bataillon, M., Cardinali, A. P. N., and Duchiron, F. (1998), *Biotechnol. Lett.* **20(11)**, 1067–1071.
26. Silva, C. H. C., Puls, J., Sousa, M. V., and Filho, E. X. F. (1999), *J. Braz. Soc. Microbiol.* **30(2)**, 114–119.
27. Khanna, P., Sundari, S. S., and Kumar, N. J. (1995), *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 242, 243.
28. Nakamura, S., Wakahayashi, K., Nakai, R., Aono, R., and Horikoshi, K. (1993), *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2311–2316.
29. Kang, M. K., Maeng, P. J., and Rhee, Y. H. (1996), *Appl. Environ. Microbiol.* **62(9)**, 3480–3482.
30. Breccia, J. D., Siñeriz, F., Baigori, M. D., Castro, G. R., and Kaul, R. H. (1998), *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 42–49.
31. Horikoshi, K. (1973), *Agric. Biol. Chem.* **35(11)**, 1783–1791.
32. Trevelyn, W. E., Procter, D. P., and Harrison, J. G. (1950), *Nature* **166**, 444, 445.
33. Miller, G. L. (1959), *Anal. Chem.* **31**, 426–428.
34. Dhillon, A., Gupta, J. K., Khanna, S. (2000), *Process Biochem.* **35**, 849–856.

Pesquisa

Glucoamilase: Estrutura e termoestabilização

Estrutura e termoestabilização de glucoamilase por técnicas moleculares

Carla M. Y. Lemos
Lab. de Bioquímica e Microbiologia aplicada
IBILCE - UNESP, Pós Graduação em Microbiologia Aplicada IB/UNESP - Rio Claro-SP

Erica Fuchs
Department of Food Science and Human Nutrition
Iowa State University, IA-USA

Eleni Gomes
Lab. de Bioquímica e Microbiologia aplicada
Departamento de Biologia
IBILCE - UNESP - São José Rio Preto-SP

Roberto Da Silva
Lab. de Bioquímica e Microbiologia aplicada,
Departamento de Química e Ciências Ambientais,
IBILCE - UNESP - São José Rio Preto-SP
dasilva@qca.ibilce.unesp.br

Ilustrações cedidas pelos autores

Resumo

A glucoamilase (GA) é uma enzima hidrolítica que catalisa a liberação sucessiva de β-D-glucose a partir do amido e oligossacarídeos relacionados. A GA catalisa eficientemente a reação de sacarificação do amido dentro de uma faixa estreita de temperatura. A sua termoestabilidade limitada afeta seu uso no processo industrial, onde a incubação prolongada em altas temperaturas é necessária. As estratégias tradicionais para melhorar a termoestabilidade da GA de *Aspergillus*, tais como a imobilização e modificação química têm falhado no uso industrial. Atualmente, as técnicas de evolução dirigida utilizando a biologia molecular proporcionam uma importante ferramenta para melhorar ou mesmo criar novas propriedades nas enzimas existentes, em um curto espaço de tempo. Esta revisão apresenta a importância, estrutura e função da glucoamilase e as recentes estratégias da biologia molecular como ferramenta para melhorar a termoestabilidade desta enzima.

1. Glucoamilase de *Aspergillus*

A glucoamilase (α-1,4-glucan glucohidrolase, EC 3.2.1.3), também conhecida como amiloglucosidase, é uma enzima hidrolítica que catalisa a quebra das ligações glicosídicas α-1,4 a partir de uma extremidade não redutora das moléculas de amilose ou amilopectina do grânulo de amido e oligossacarídeos relacionados liberando β-D-glucose. Em uma velocidade menor, a glucoamilase também atua hidrolisando as ligações α-1,6 (Fleetwood e Weigel, 1962). Sugere-se, portanto, que a ação da glucoamilase ocorra através de um mecanismo multisseriado no qual a enzima atua aleatoriamente em toda a molécula de substrato (James e Lee, 1997).

A glucoamilase (GA) é amplamente usada na indústria alimentícia para a produção de xaropes com alto teor de glucose e também é empregada na produção de álcool e xaropes com alto teor de frutose (1989; Brumm, 1998; Mathewson, 1998).

Vários microrganismos, plantas e animais produzem glucoamilase. Estas enzimas disponíveis comercialmente são, na sua maior parte, produzidas por linhagens dos fungos *Aspergillus* e *Rhizopus*. Dentre estas, a glucoamilase de *Aspergillus* é a mais termoestável, apresentando a máxima atividade em torno do pH 4,5, em temperaturas de 50 a 55°C, mas ela é rapidamente inativada em temperaturas próximas a 60°C (Manjunath *et al.*,1983; Brumm, 1998).

A glucoamilase catalisa eficientemente a reação de sacarificação dentro de um limite relativamente estreito de temperatura, porque a sua conformação cataliticamente ativa muda com o aumento da temperatura. Esta termoestabilidade limitada afeta seu uso no processo industrial, onde a atuação prolongada em altas temperaturas é necessária. Na produção de xaropes com alto teor de glucose, uma pasta de amido (30-40% BS) é primeiro liquefeita a 105°C por 5 minutos e em seguida,

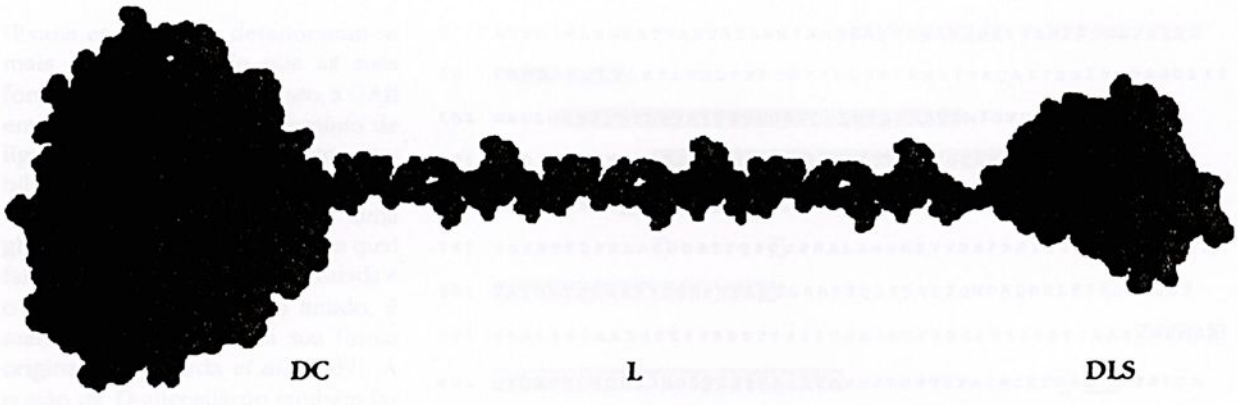


Figura 1. Imagem da estrutura estendida da glucoamilase de *Aspergillus niger* idêntica a glucoamilase de *Aspergillus awamori*. No lado esquerdo o domínio catalítico (DC), ao centro o filamento ligante ou "linker" (L) e à direita o domínio de ligação ao substrato (amido) (DLS).
http://nte-serveur.univ-lyon1.fr/nte/heyde/www.public.iastate.edu/_pedro/glase/glase.html (10/10/03)

a 95°C por 2 horas, usando a a-amilase bacteriana termoestável, em pH 6.0-6.5. Finalmente, o amido liquefeito é resfriado a 60°C e hidrolisado por mais 48 a 72 horas usando a glucoamilase (James e Lee, 1997, Brumm, 1998). Está claro que a termoestabilidade da glucoamilase determina a velocidade do processo como um todo. Trabalhar em altas temperaturas não apenas pode acelerar a taxa da reação e consequentemente diminuir o tempo do processo, como também pode prevenir a contaminação microbiológica, além de reduzir a viscosidade da mistura de reação. Portanto, o desenvolvimento de uma glucoamilase mais termoestável poderá contribuir para a otimização do processo de sacarificação do amido. Entretanto, o conhecimento da estrutura da proteína e o processo de termoinativação da enzima são necessários para elaboração de prognósticos racionais e planos efetivos de experimentos de estabilização da estrutura proteica.

A glucoamilase de *Aspergillus* é codificada por um único gene, mas existem duas ou três formas variáveis da enzima produzidas por proteólise limitada (Svensson *et al.*, 1986). Pazur *et al* (1971) constatou que as formas da glucoamilases de *Aspergillus niger* são glicoproteinas que possuem quantidades diferentes de glicosilações. Como em outras proteínas, após a síntese no citoplasma, a GA é transportada em um estado desdobrado através da membrana do retículo endoplasmático (RE). Durante o subseqüente processo de dobramento, ocorre a *O*-glicosilação do "linker", filamento que liga o domínio catalítico (CD) ao domínio de ligação ao substrato (DLS), e pontes dissulfetos são formadas (Pryer *et al*, 1992; Gaut e Hendershot, 1993). Assim, a GA, na sua conformação nativa estendida, assume uma forma de alteres, onde dois domínios volumosos, o domínio catalítico e o domínio de ligação ao amido, estão ligados por um filamento fino como mostra a figura 1. Esta é uma imagem simplificada ilustrativa, uma vez que a estrutura real da GA completa ainda não está disponível. A organização dos domínios da molécula tem sido deduzida através das diferentes técnicas biofísicas e relatos disponíveis (Coutinho, 1997; Sauer, 2000).

As inúmeras proteínas desdobradas, que entram no lúmem do RE, devem ser protegidas de quaisquer agressões e serem mantidas em um estado de dobramento-competente. Dobramentos ineficientes ou mutações em proteínas secretadas resultam em enzimas com conformação incorreta e defeito na atividade (Bonifacino e Klausner, 1994).

Em *Aspergillus awamori*, o gene codifica uma GAI de tamanho completo contendo de 615 a 616 resíduos de aminoácidos (figura 2), bem como o peptídeo sinalizador de secreção no N-terminal. O peptídeo sinalizador é cortado após a secreção da proteína pela célula. O outro maior produto de proteólise da GAI (diz-se da GA competente) é a GAII resultante da perda do sítio de ligação ao substrato localizado na extremidade C-terminal. A GAII é uma mistura de polipeptídeos de tamanhos entre 512 e 514 resíduos de aminoácidos, com atividade catalítica normal mas sem a habilidade para se ligar ao amido no estado natural, não gelatinizado (Svensson *et al.*, 1986).

As proteínas originais de *Aspergillus niger* e *Aspergillus awamori*, cujas seqüências são idênticas (Svensson *et al.*, 1989; Nunberg *et al.*, 1984), consistem de três principais áreas funcionais (Coutinho e Reilly, 1994 a-b, Coutinho e Reilly, 1997): (1) o domínio catalítico, constituído dos resíduos 1 ao 440, (2) o filamento ligante, formado pelos resíduo 441 ao 512, que é altamente *O*-glicosilado, e (3) um domínio de ligação ao amido no estado natural na extremidade C-terminal, contendo os resíduo 513 a 616 (Svensson *et al.*, 1986; *et al.*, 1989). Além da região de *O*-glicosilação do "linker", dois outros sítios de *N*-glicosilação estão localizados nos resíduos Asn 171 e Asn 395 (Svensson *et al.*, 1989; Aleshin *et al.*, 1992). Acredita-se que os resíduos de carboidratos desempenham uma importante função na estabilização da glucoamilase (Manjunath *et al.*, 1983, Svensson *et al.*, 1989; Williamson *et al.*, 1992a). Em altas temperaturas, a GA de *A. niger*, quimicamente desglicosilada, (Shenoy *et al.*, 1984) e a glucoamilase de *A. awamori*, geneticamente truncada, sem parte da região de *O*-glicosilação

(Evans *et al*, 1990), deterioraram-se mais rapidamente do que as suas formas selvagens. Além disso, a GAII em que falta apenas do domínio de ligação ao substrato, tem termoestabilidade similar a da GAI (Svensson *et al.*, 1986), enquanto que uma glucoamilase especial (GAI'), na qual faltam parte da região *O*-glicosilada e o domínio de ligação ao amido, é menos estável do que a sua forma original (Hayashida *et al.*, 1989). A região de *O*-glicosilação também facilita a secreção de GA (Evans *et al.*, 1990).

A estrutura da GA nativa é muito difícil de determinar em função do alto grau de glicosilação. Aleshin *et al* (1992) determinou a estrutura cristalina de uma GA muito próxima da forma nativa denominada *A. awamori var. X100* (GA') (figura 3), a qual foi obtida por proteólise limitada com subtilisina e apresenta os primeiros 470 resíduos de aminoácidos da proteína original. Esta seqüência de aminoácidos da GA' é 99,4% similar a GAI de *A. niger* e *A. awamori*, com uma deleção no resíduo 102 (Aleshin *et al*, 1992, 1994a). Assim, o estudo desta estrutura cristalina elucidou a conformação do domínio catalítico completo e a conformação da primeira metade *N*-terminal da região *O*-glicosilada da glucoamilase de *Aspergillus*. A estrutura cristalina da GA de *A. awamori var. X100* mostrou que o domínio catalítico consiste de treze a-hélices que compreendem cerca de 51% dos resíduos de aminoácidos do polipeptídeo total, e regiões menores de β filamentos antiparalelos. Doze das α-hélices estão arranjadas dentro de uma estrutura denominada barril α/α, consistindo de seis α-hélices externas e seis internas que envolvem o sítio catalítico em forma de funil, constituído por seis segmentos α/α altamente conservados (Sauer, 2000). O sítio catalítico da GA possui uma barreira de resíduos hidrofóbicos no centro, os quais separam o núcleo em duas regiões de volume morto (void), contendo apenas água. Uma serve como o sítio ativo propriamente dito e a outra, tem uma função ainda não conhecida (Aleshin *et al.*, 1994a). O sítio ativo contém Glu179 e Glu400

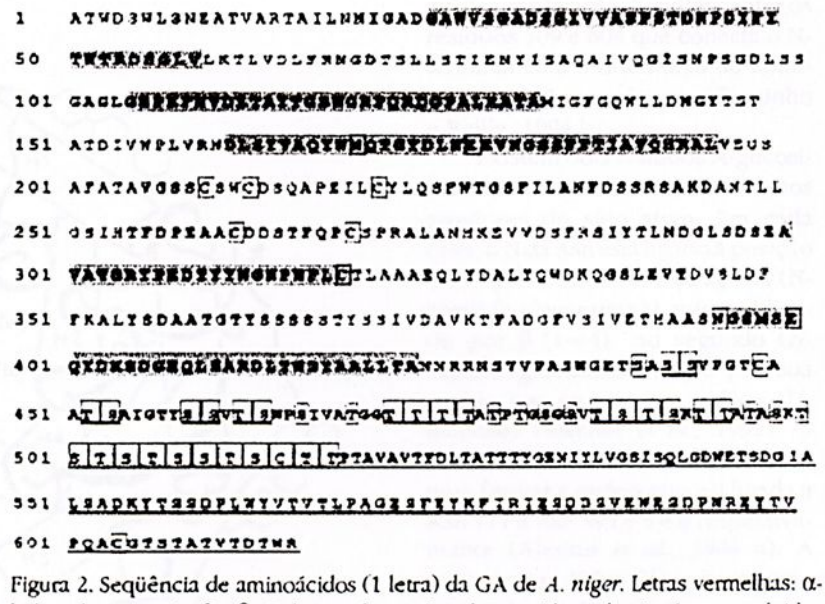


Figura 2. Seqüência de aminoácidos (1 letra) da GA de *A. niger*. Letras vermelhas: α-helice; letras azuis: fita-β; C dentro dos retângulos: resíduos de cisteínas envolvidos em pontes dissulfetos; N dentro dos retângulos: sitios *N*-glicosilados; T e S dentro dos retângulos: sítios *O*-glicosilados; E dentro dos retângulos: resíduos dos aminoácidos catalíticos glutâmico 179 e 400; seqüências sombreadas: regiões conservadas S1 a S5; seqüência sublinhada: sitio de ligação ao substrato. Fonte: Flory, 1993.

como os dois resíduos de aminoácidos catalíticos localizados no fundo do sítio (Harris *et al.*, 1993; Sauer, 2000). A estrutura em barril α/α do DC da GA de *A. awamori*, *A. niger* e de *Saccharomyces fibuligera* são similares, sendo que esta última apresenta 14 α-hélices, 12 das quais estão na conformação barril α/α (Sevcik *et al*, 1998; Sauer *et al*, 2000). Esta conformação contrasta com a topologia de organização em barril α/β encontrada em outras enzimas amilolíticas tais como α e β-amilases (Buisson *et al.*, 1987; e Mikami *et al.*, 1993) e ciclodestrina glucosiltransferases (Klein e Schulz, 1991). Observou-se uma pequena similaridade entre a estrutura da GA e proteínas transportadoras de glucose. Assim, a organização das hélices na GA pode ser relevante para a conformação de proteínas que transportam glucose (Aleshin *et al*, 1994a).

O segmento *O*-glicosilado está numa conformação de cinto estendido em torno do barril α/α catalítico. Isto sugere que este segmento serve como um elo de ligação estrutural entre o domínio catalítico e o domínio de ligação. A primeira parte (aminoácidos 441 a 471) desta região *O*-glicosilada possui cerca de 10 resíduos de manoses expostos, que juntos com 2 unidades de glucoses ligadas *N*-glicosidicamente nos resíduos Asn 171 e Asn 395, formam um cinto de glicosilações ao redor do domínio catalítico (Aleshin *et al*, 1992). Foi sugerido que a outra parte altamente *O*-glicosilada (aminoácidos de 472 a 512) envolva o domínio catalítico como uma continuação do resíduo 471, fazendo com que o domínio de ligação ao amido fique próximo ao sítio ativo (Sauer *et al*, 2000). O segmento C-terminal do "linker" contém cerca de 30 aminoácidos, principalmente serina e treonina, sendo, portanto, muito *O*-glicosilado. A esta parte particular do linker tem sido atribuída papéis na estabilidade, secreção e na digestão do amido cru (Libby *et al*, 1994; Sauer *et al*, 2000). Embora algumas características como a compactação da conformação do barril α/α, a proteção dos carboidratos e a região *O*-glicosilada, façam a GA de *Aspergillus* mais estável do que algumas proteínas, uma maior estabilidade ainda é requerida para os processos industriais, como explicado anteriormente.

O domínio de ligação ao amido possui este nome por causa da sua capacidade de se ligar ao grânulo de amido nativo e permitir sua digestão pelo domínio catalítico (Svensson *et*

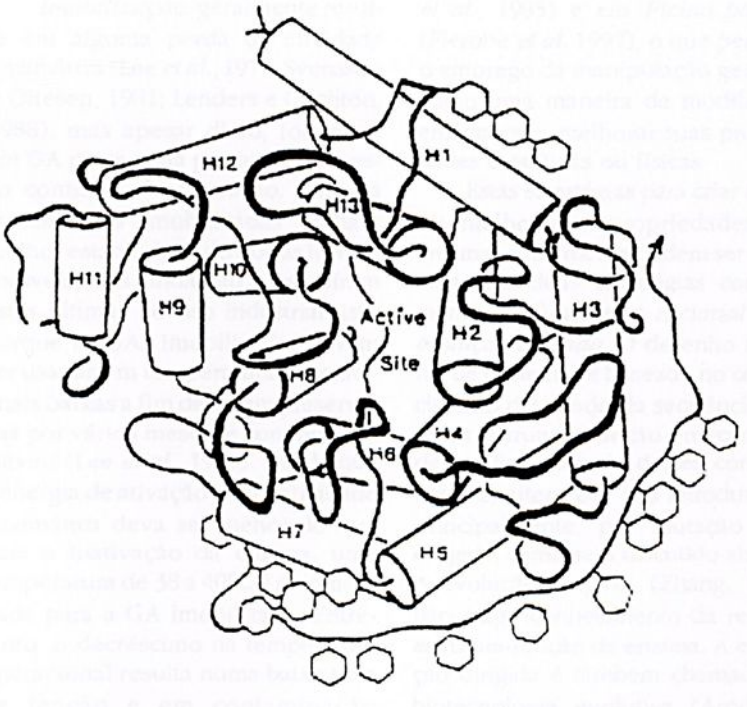


Figura 3. Esquema da glucoamilase (GA') de *Aspergillus awamori var. X100 (Aleshin et al.*, 1992). α- hélices (H1 a H13) são simbolizadas por cilindros, sítios de *O*-glicosilação são representados por hexágonos simples, e sítios de *N*-glicosilação são simbolizados por cadeias de três hexágonos.

al., 1983). Este domínio parece ter a capacidade de ligar a GA à parede da célula isto porque tem afinidade por α-1,4 e α-1,6 glucanos que pertencem à parede celular. Esta afinidade aumenta a concentração de GA próxima da micromembrana da célula (Neustroev *et al.*, 1993). A GAII, na qual faltam os resíduos 513 a 616, tem uma habilidade semelhante a GAI para digerir amido solúvel, mas possui uma habilidade drasticamente reduzida para se ligar e hidrolisar o amido nativo (Svensson *et al.*, 1989). Recentemente, foi demonstrado que o DLS isolado, atuando em grânulos de amido juntamente com a GAII, apresentaram um efeito sinergístico na degradação do substrato insolúvel, sugerindo que o domínio de ligação ao substrato se liga ao amido como uma porção individual e rompe a compacta estrutura do grânulo de amido facilitando a hidrólise pelo domínio catalítico (Southall *et al*, 1999; Sauer *et al*, 2000). O domínio de ligação ao amido da GA possui uma significante similaridade de seqüência de aminoácidos com o domínio de ligação ao amido da ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) (Svensson *et al.*, 1989). A estrutura tridimensional da CGTase é globular, contendo de 6 a 8 fitas β (Klein e Schulz, 1991). A estrutura do domínio de ligação ao amido da GA revela uma estrutura bem definida em fitas β consistindo de um par paralelo e 6 pares antiparalelos que formam um barril β aberto na lateral. Dois sítios de ligação para outros ligantes foram encontrados neste domínio, sendo cada um no final da molécula em faces opostas (Sorimachi *et al.*, 1996). O mecanismo proposto de ligação deste domínio aos grânulos de amido, parece envolver a formação de um complexo de inclusão entre os resíduos hidrofóbicos do domínio de ligação e os grânulos de amido (Goto *et al.*, 1994).

Existem quatro pontes dissulfetos na GA, das quais três estão no domínio catalítico e uma no domínio de ligação. No domínio catalítico, as pontes estão entre os resíduos 210 e 213 (conectando o N-terminal com o meio da hélice 7), 262 e 270 (contendo um filamento β antiparalelo) e 222 e 449 (associando o trigésimo resíduo *O*-glicosilado do "cinto" com o domínio catalítico) (Aleshin *et al.*, 1992). Experimentos sugerem que existe uma ligação dissulfeto entre os resíduos 509 e 604 que conecta o N-terminal com o C-terminal do domínio de ligação ao substrato (Coutinho e Reilly, 1994 b).

Existem dois resíduos N-glicosilados (Asn 171 e Asn 395) na GA, nos arredores do sítio ativo. Em cada caso, o N da Asn está ligado à posição C1 do primeiro resíduo de açúcar (N-acetil-D-glucosamina), que está ligado por β (1→4) ao segundo (N-acetil-D-glucosamina) que por sua vez se liga ao terceiro resíduo (D-manose) (Aleshin *et al.*, 1992). O número total de resíduos de açúcares para formar a cadeia glicosil ligada a Asn 171 e Asn 395 é 5 e 8 respectivamente (Aleshin *et al.*, 1994 a). A mutação Asn 395→ Gln que removeu o sítio de N- glicosilação no resíduo 395, diminuiu drasticamente tanto a secreção como a termoestabilidade, mas não alterou a atividade específica (Chen *et al.*, 1994 b).

Embora a GA de *A. awamori* primariamente catalise a clivagem hidrolítica de ligações a (1,4) com liberação de β-glucose a partir de uma extremidade não redutora da cadeia de amido e oligossacarídeos, ela também cliva ligações glicosídicas a (1,6) com uma eficiência catalítica (K_{cat}/ Km) por volta de 500 vezes menor do que para as ligações a (1,4) (Fleetwood e Weigel, 1962).

2. Termoestabilização da Glucoamilase

2.1. Estratégias tradicionais

A modificação química e a imobilização são as duas principais estratégias tradicionais que têm sido exploradas para melhorar a termoestabilidade da GA.

Modificação química: altera um grupo funcional específico nas proteínas, tal como um grupo carboxila, por reação química. Embora esta técnica tenha aumentado a estabilização da a α-quimotripsina em 1000 vezes (Moshaev *et al.*, 1988), ela geralmente tem um rendimento negativo ou relativamente muito pequeno na termoestabilização da GA (Sinitsyn *et al.*, 1978; Munch e Tritsch, 1990).

Imobilização: geralmente resulta em alguma perda da atividade enzimática (Lee *et al.*, 1976; Svensson e Ottesen, 1981; Lenders e Crichton, 1988), mas apesar disso, foi usada em GA porque ela permite o processo contínuo de operação. Embora muitas GAs imobilizadas tenham melhor estabilidade do que as formas solúveis, elas ainda não substituíram estas últimas no uso industrial, isto porque as GAs imobilizadas devem ser usadas em temperaturas operacionais baixas a fim de serem preservadas por vários meses, e continuarem viáveis (Lee *et al.*, 1976). Desde que a energia de ativação para a atividade enzimática deva ser menor do que para a inativação da enzima, uma temperatura de 38 a 40°C é recomendada para a GA imobilizada. Entretanto, o decréscimo na temperatura operacional resulta numa baixa taxa de reação e em contaminação microbiológica, que é menos facilmente controlado em fábricas do que em laboratório. Lee *et al.*, (1976) relataram que a GA imobilizada rendeu xaropes com teores mais baixo de glucose, 1,0-1,5%, e de Dextrose Equivalente (DE), 1,0-1,5 unidades, do que aqueles produzidos por enzimas solúveis. Isto é atribuído a limitação da difusão de partículas de glucose, que resulta em um gradiente de concentração de glucose e, consequentemente, leva a uma maior incidência de reações reversíveis do que se o gradiente não estivesse presente (Lee *et al.*, 1980). Além disso, numa aplicação real, as altas concentrações do substrato estabilizam tão bem a GA que o aúmento da termoestabilização proporcionado pela imobilização torna-se relativamente insignificante (Klesov e Gerasimas, 1979).

2.2. Estratégias moleculares (Evolução Dirigida de Enzimas)

O advento da engenharia de proteínas, empregando técnicas de biologia molecular, proporcionou novas estratégias para a termoestabilização de enzimas. O gene da GA de *A. awamori* foi clonado e expressado em *Saccharomyces cerevisiae* (Innis *et al.*, 1985) e em *Pichia pastoris* (Fierobe *et al.* 1997), o que permitiu o emprego da manipulação genética como uma maneira de modificar a enzima para melhorar suas propriedades catalíticas ou físicas.

Estas estratégias para criar novas ou melhoradas propriedades em enzimas, atualmente podem ser separadas em duas estratégias complementares *1) desenho racional* e *2) evolução dirigida*. O desenho racional de proteínas é baseado no conhecimento detalhado da seqüência primária, estrutura, função e mecanismo de catálise. Através destes conhecimentos, alterações são introduzidas, principalmente, por mutação sitio dirigida, como será discutido abaixo. A evolução dirigida, (Zhang, 1997) não exige conhecimento da relação estrutura-função da enzima. A evolução dirigida é também chamada de biotecnologia evolutiva (Arnold e Volkov, 1999; Reetz e Jaeger, 1999; Sutherland,2000). O termo evolução dirigida subtende uma série de experimentos que reproduzem, de forma acelerada e em tubos de ensaios, a evolução da diversidade natural e adaptação ambiental. Mutações e recombinações são feitas dando ao processo uma direção no sentido de atingir a otimização de uma propriedade específica (Lehman e Wyss, 2001). Muitas pistas de como melhorar enzimas vêm dos estudos de como as enzimas evoluem na natureza. Assim, esta poderosa técnica objetiva otimizar o processo de melhoramento das enzimas utilizando mecanismos envolvidos na evolução natural (mutação, recombinação e seleção natural). Entretanto, a evolução dirigida difere do processo natural no sentido em que são os pesquisadores que definem as propriedades a serem otimizadas e o processo biotecnológico acontece em um período curto de tempo (semanas ou meses) (Reetz, 1999).

Num experimento de evolução dirigida, primeiramente é induzida uma alteração no DNA visando uma resposta específica. Isto resulta em uma biblioteca de populações com diferentes graus de possíveis respostas, incluindo ou não a resposta esperada. O próximo passo é encontrar dentre as milhões de possibilidades, a solução ou as soluções corretas, ou seja, a enzima que exibe a propriedade desejada (Arnold, 1996).

Em suma, este processo consiste na combinação de técnicas da biologia molecular apropriadas para a mutação e expressão do gene, acopladas a um eficiente e rápido sistema de seleção. (Reetz e Jaeger, 2000). A idéia é partir de uma enzima selvagem, realizar a mutagênese no gene que codifica a enzima e selecionar os melhores mutantes de acordo com a característica fenotípica desejada (Zhang, 1997). Após a seleção dos mutantes, segue-se novos ciclos de mutações buscando melhores mutantes.

Quando a taxa de mutação, tamanho da biblioteca e o processo de seleção são adequados, o fenótipo desejado de uma enzima geralmente aumenta a cada ciclo de mutações (Zhang, 1997).

Existe um grande número de diferentes estratégias de mutagênese para criar diversidade de seqüências, tais como a mutação pontual ao acaso por PCR mutagênico (error-prone PCR), e o embaralhamento de DNA (DNA shuffling). Combinações destas técnicas também vêm sendo utilizadas. Tais estratégias serão discutidas a seguir:

2.2.1 Mutação Sítio Dirigida (MSD)

É uma poderosa técnica na qual apenas um ou poucos aminoácidos específicos são substituídos por outros aminoácidos, por alteração nos correspondentes nucleotídeos no gene codificador da proteína. Quando realizada com sucesso, ela tem a vantagem de melhorar a característica desejada da enzima sem afetar outras propriedades e até mesmo de criar mutantes carregando várias características melhoradas.

Nesta ferramenta, as mudanças precisas, efetuadas na seqüência dos aminoácidos, são baseadas no conhecimento detalhado da estrutura da proteína, função e mecanismo (Chen, 1999). Por exemplo, um resíduo particular de aminoácido pode ser identificado como sendo importante para

a atividade catalítica da enzima (Reetz, 1999), sendo assim, uma substituição individual deste aminoácido poderia provocar mudanças na estrutura secundária resultando em enzimas com características desejáveis (Chen, 1999). Entretanto, seria impossível predizer qual dos 19 aminoácidos remanescentes seria o melhor alvo para a mutação que resultaria em subsequente melhoria da propriedade procurada (Reetz, 1999). Muitas tentativas para alterar especificamente algumas das propriedades das enzimas através desta técnica falharam, isto porque a introdução de aminoácidos substitutos têm efeitos inesperados na estrutura e função da enzima. (Kikuchi, 1999). Além disso, tem sido observado que em muitos estudos de mutação sítio dirigida, o aumento da termoestabilidade está vinculada ao decréscimo da atividade catalítica (Carrea e Colombo, 2000). As falhas também podem ser porque este processo requer conhecimento de detalhes da estrutura tridimensional da enzima, de seu mecanismo de catálise, bem como um certo grau de intuição na escolha do aminoácido a ser substituído (Reetz, 1997). Em muitos casos, estas substituições foram feitas sem levar em consideração as propriedades estruturais da proteína (Chen, 1999).

2.2.2. PCR mutagênico (Error-prone PCR):

A introdução de mutações através desta técnica envolve uma modificação no protocolo de PCR (Jaeger e Reetz, 2000). Uma reação de PCR é normalmente realizada de modo a amplificar qualquer dado DNA com alta fidelidade. A atividade de correção de erro 3' → 5' da DNA polimerase assegura que a amplificação do DNA siga de maneira precisa. Ocasionalmente, nucleotídeos errados são incorporados durante a amplificação levando a mutações com uma freqüência de 0,1 a 2x 10^{-4} por nucleotídeo para a DNA polimerase termoestável do *Thermus aquaticus* (Taq polimerase). Esta baixa taxa de erro pode ser aumentada para 7x 10^{-3} por nucleotídeo através de um ou mais dos seguintes procedimentos: aumento da concentração de $MgCl_2$, adição de $MnCl_2$, aumento na concentração de dCTP e dTTP e aumento na quantidade taq polimerase. Para o propósito de evolução dirigida de enzima, estas condições devem ser modificadas a fim de se obter uma taxa média de 1 a 2 nucleotídeos mutados por gene, levando a uma mudança média de 1 aminoácido por enzima mutante (Reetz, 1999). A vantagem de tal processo é que pode ser realizado rapidamente envolvendo qualquer proteína, mesmo sem o conhecimento preciso de sua estrutura (Zhang *et al*, 1997 e Jaeger e Reetz, 2000).

2.2.3. Embaralhamento de DNA (DNA shuffling)

Este poderoso processo de evolução dirigida, que gera diversidade por recombinação, é baseado na combinação de mutações úteis de genes individuais. Bibliotecas de genes quiméricos podem ser geradas por fragmentação aleatória de um gene, seguido por recombinação dos fragmentos em uma reação de PCR (Crameri, 1998).

O embaralhamento de DNA combinado com uma seleção para a atividade pode acelerar a evolução dirigida das características desejadas. Nesta técnica, a diversidade é introduzida a partir de uma biblioteca de mutações pontuais aleatórias (Christians *et al*, 1999). Os genes selecionados podem ser submetidos a mais ciclos de mutações (reembaralhamento) e melhorar ainda mais a sua mutação benéfica original (Stemmer, 1994a) simulando de forma acelerada, o processo natural de recombinação sexual (Christians *et al*, 1999).

A técnica consiste basicamente na fragmentação de um gene com diferentes mutações pontuais por *DNAse I*. A recombinação dos fragmentos aleatoriamente resulta em moldes trocados e recombinados. Um gene recombinante contendo 4 "crossovers" pode ser selecionado da biblioteca de recombinantes baseado na função melhorada. O conjunto selecionado promove o ponto de partida para outro ciclo de mutações e recombinações. Este processo isolado causa um baixo número de mutações pontuais, mas se for desejado, mutações adicionais podem ser incorporadas por PCR mutagênico ou mutagênese por UV no "pool" de genes (Stemmer, 1994a).

A técnica de embaralhamento pode ser realizada com mutantes do mesmo gene e também com genes homólogos de diferentes espécies (family shuffling) (Reetz e Jaeger, 1999). Esta recente adaptação permite que duas ou mais seqüências que ocorram naturalmente sejam usadas como material genético iniciador. Neste método, genes similares são misturados, fragmentados aleatoriamente e recombinados sob condições que permitam o anelamento e a extensão de fitas complementares não idênticas (Christians *et al*, 1999). A recombinação que ocorre nesta técnica é causada pela incorporação de um fragmento derivado de uma seqüência dentro de outra, baseado na homologia.

Análises evolutivas de famílias de enzimas sugerem que mudanças drásticas na função da enzima exigem uma considerável mudança na seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo. Tais mudanças provavelmente não ocorrem durante o processo de evolução *in vitro*, no qual as enzimas são principalmente melhoradas por mutações de ponto com uma tendência a transições e transversões limitando o acesso a um amplo espectro de substituições. Em contraste, a mutação natural, tipicamente resultante de recombinação sexual ou homóloga, gera deleções, inserções, duplicações ou fusões. Neste último processo, tais mutações alteram o espaçamento entre os resíduos de aminoácidos e segmentos de cadeias de polipeptídeos e pode resultar em mudanças na especificidade e novas atividades catalíticas (Chen, 2001).

"Screening" e Seleção: Grandes bibliotecas de mais de 10^{10} genes mutantes podem facilmente ser criadas usando as técnicas acima. Portanto, o desenvolvimento de um sistema apropriado de seleção é de importância chave no processo de evolução dirigida de enzimas (Reetz, 1999). Seleções efetivas, nas quais

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

apenas aqueles clones carregando a característica desejada sobrevivam ou cresçam mais rápido são raras (Arnold e Volkov, 1999). No caso do emprego de vetores (plasmídios), o "screening" é feito para obter os mutantes que incorporaram o vetor contendo o gene desejado. O vetor geralmente carrega um gene para resistência a algum antibiótico, por isso utiliza-se o plaqueamento das linhagens submetidas ao processo de mutagênese em um meio contendo o antibiótico. As colônias que crescerem neste meio, certamente incorporaram o vetor e podem ser escolhidas para a próxima etapa. Em outros casos, a mutação positiva resulta em reparo de algum defeito que poderá ser usado como ferramenta para a seleção. Por exemplo, a recuperação da habilidade de produção de enzimas formadoras de halos na placa de seleção. A etapa seguinte é a escolha de colônias que tenham a característica desejada, por exemplo, o aumento na termoestabilidade enzimática. Assim, as enzimas das colônias positivas no "screening" serão submetidas a testes de termoinativação a fim de se isolar as colônias produtoras de enzimas termoestáveis.

2.3. Enzimas termoestabilizadas por estratégias moleculares

Akanuma *et al* (1998) introduziram o gene *leuB* (que codifica para a 3-isopropilmalato desidrogenase envolvida na biossíntese de leucina) no microrganismo termofílico *Thermus thermophilus* usando técnicas de evolução dirigida de enzimas. Após mutação no gene da enzima, eles obtiveram uma variante termoestável. A estabilidade térmica da enzima mutante foi 10°C acima da observada na enzima selvagem.

A técnica da evolução dirigida foi aplicada à kanamicina nucleotidiltransferase (KNTase), uma enzima que confere resistência ao antibiótico kanamicina. Variantes desta enzima apresentaram resistência a kanamicina a uma temperatura de 63°C e foram produzidas por dois ciclos seguidos de mutações resultando em duas substituições de aminoácidos (Reetz e Jaeger, 1999).

Kikuchi *et al* (1999) aplicaram esta técnica nos genes *xylE* e *nahH* que codificam para a enzima catecol 2,3-dioxigenase. Mais de 2000 clones híbridos foram criados e posteriormente selecionados para estabilidade térmica. A melhor enzima quimérica selecionada foi testada a 50°C e a vida média foi de 70 min, muito maior do que a enzima codificada pelos genes selvagens *xylE* (2,7min) e *nahH* (5,4min).

Yang *et al* (2000) criaram um mutante para o gene da subtilisina E através da técnica de PCR mutagênico. Análises do seqüenciamento revelaram apenas uma substituição (A→G). O tempo de vida médio da atividade da enzima mutante, quando encubada a 65°C, foi de aproximadamente 80 min enquanto que uma outra linhagem mutante (mutante original usado no PCR mutagênico) e a linhagem selvagem apresentaram um tempo de 13 e 15 min respectivamente.

Miyazaki *et al* (2000) usaram a técnica de embaralhamento de DNA em uma subtilisina S41 psicrofílica com o objetivo de aumentar sua termoestabilidade e atividade. Após a terceira geração de bibliotecas criadas por PCR mutagênico, três variantes termoestáveis foram identificadas. Das três, uma enzima mutante em particular teve a maior atividade residual após incubação a 70°C. Esta subtilisina S41 variante contém 7 substituições de aminoácidos, todas contribuindo para o aumento da sua termoestabilidade.

A temperatura ótima da lipase foi aumentada em até 15°C através da mutagênese aleatórea utilizando a técnica de PCR com tendência ao erro (Kohno *et al*, 2001).

Utilizando-se da técnica de embaralhamento de DNA Hayashi *et al*. (2001), obtiveram quimeras de β-glucosidase com a termoestabilidade aumentada em até 16°C quando comparadas com a enzima original.

A evolução dirigida foi também usada para melhorar a termoestabilidade da galactose oxidase (Sun *et al*, 2001). Foi observado que as enzimas mutantes obtidas, mantinham a atividade enzimática e a especificidade pelo substrato semelhantes às da enzima selvagem, entretanto, a termoestabilidade foi aumentada. O T_{50} (temperatura na qual as enzimas perdem 50% da sua atividade) foi aumentado para 67°C para os dois mutantes mais termoestáveis enquanto que a selvagem não ultrapassou 63°C.

Experimentos com a GA usam na sua grande maioria a MSD como ferramenta para a obtenção de características desejadas melhoradas, uma boa revisão neste assunto foi apresentada por Ford (1999). Várias abordagens preconizadas para estabilização podem ser acessadas pela MSD, como por exemplo, as substituições dos resíduos flexíveis de glicina em α-helices, substituições de seqüências susceptíveis a desamidação e quebra Asn-Gly, alterações em ligações frágeis como Asp-X, introdução de prolina que reduz o número de conformações no estado desdobrado, acréscimo cisteínas para aumentar o número de pontes dissulfetos, além de combinações destas abordagens em mutantes múltiplos etc. (Ford, 1999; Sauer, 2000).

Libby *et al* (1994) testaram o efeito de deleções de aminoácidos na região *O*-glicosilada da GA de *Aspergillus awamori*. Foram feitas deleções para remover os resíduos de 466 a 512 (GAI), de 485 a 512 (GAII) e de 466 a 483 (GAIII). Analisando as frações intracelulares e extracelulares, observou-se que a região deletada da GAIII afetou a secreção enquanto que a deleção da GAII contribuiu para a produção e uma estrutura estável da proteína. Para todos os mutantes foram encontradas atividades catalíticas similares à selvagem indicando que as deleções não afetaram o sítio catalítico.

Chen *et al*. (1994) substituíram a seqüência susceptível a desamidação, Asn182-Gly, por Ala182-Gly, o que resultou em decréscimo de 2,5 vezes na taxa de termoinativação a 60 e 65°C.

O efeito da substituição de resíduos flexíveis de glicina por alanina em quatro diferentes α-hélices na GA de *Aspergillus awamori* foram estudados (Chen *et al*, 1996). Substituições simples de Gly137 e Gly139 e

no mutante múltiplo contendo ambas as mutações estabilizaram a GA contra a termoinativação irreversível.

Com o objetivo de estudar o papel das regiões conservadas na GA de *Aspergillus awamori*, Sierks *et al* (1993) realizaram substituições nos resíduos de Leu177, Trp178 e Asn182 por His, Arg e Ala, respectivamente. Quando se substituiu Leu177 por His houve um grande aumento na energia de ativação para substratos com ligação $\alpha(1\rightarrow4)$ e $\alpha(1\rightarrow6)$; na substituição Trp178 por Arg, a energia aumentou para substratos com ligações $\alpha(1\rightarrow6)$, mas não para $\alpha(1\rightarrow4)$. Estas substituições indicaram que os resíduos de aminoácidos Leu177 e Trp178 estão localizados no subsítio 1 e 2 respectivamente. Por outro lado, a substituição Asn182 por His não alterou os valores de energia de ativação para nenhum tipo de ligação do substrato, sugerindo que este resíduo não é crucial para o mecanismo catalítico da GA.

Fiorobe *et al.* (1996) substituiram Ala246 por Cys, criando mais uma ponte dissulfeto entre este resíduo e o resíduo Cys320. O mutante apresentou maior atividade residual e atividade catalítica por 15 minutos comparado a linhagem selvagem. Fiorobe *et al.* (1998) produziram um mutante substituindo o Glu 400 por Cys. A atividade do mutante, após oxidação da cisteina para acido cisteinosulfínico, elevou a atividade do mutante para 160% em relação a linhagem selvagem. Entretanto, não houve ganho de termoestabilidade.

Uma ponte dissulfeto foi criada substituindo Asn20 e Ala27 por Cys na GA de *Aspergillus awamori* e observou-se um aumento na termoestabilidade de 1,2 kJ/mol a 65°C (Li *et al*, 1998).

Mutantes contendo prolina em substituição a vários aminoácidos foram estudados por Allen *et al.* (1998). O maior sucesso com mutação simples foi obtido no mutante Ser30→Pro, resultando em um aumento da energia livre de termoinativação de 1,6 kJ/mol a 65°C. Os autores ainda combinaram diferentes mutações termoestáveis e obtiveram um triplo mutante contendo Gly137→Ala, Ser30→Pro e Asn20→Cys/Ala27→Cys que apresentou aumento cumulativo de termoestabilidade de 4,4 kJ/mol.

Estes experimentos, embora tenham como objetivo principal a melhora em propriedades da enzima, paralelamente desempenham um papel de extrema importância, o de elucidar as funções de inúmeros segmentos da cadeia polipeptídica da proteína.

3. Conclusão e perspectivas futuras

As técnicas de evolução dirigida disponíveis, associadas a considerações teóricas e às várias experiências relatadas de sucesso ou não, disponíveis na literatura, têm levado a uma crescente seleção de mutações bem sucedidas para termoestabilização da GA. Todavia, este sucesso ainda não refletiu significativamente na produção de enzima industrialmente satisfatória, deixando o campo ainda aberto para novas experiências.

Os organismos atualmente disponíveis para clonagem e expressão da GA são mesofílicos, criando dificuldades para a seleção de enzimas mais termoestáveis. Além disso as linhagens de *E. coli* utilizadas são deficientes em glicosilação e formação de pontes dissulfetos, essenciais para a GA ativa. Pesquisas com bacterias termofílicas e/ou bacterias competentes para a clonagem e expressão da GA estruturalmente ativa, podem ser alternativas viáveis para reduzir tempo e manipulação.

A maior parte das informações sobre seqüências de GA são dos fungos mesofílicos, *A. niger* e *A. awamori*. Informações de seqüências de GAs termoestáveis, seriam importantes para orientação racional de desenhos de experimentos de evolução dirigida. Entretanto, poucas GAs termoestáveis de fungos termofílicos foram relatadas. Dentre estes estão *Humicola grisea* var. *thermoidea* (Tosi *et al.* 1993), *Aspergillus fumigatus* (Brandani e Peralta, 1998) e *Thermomyces lanuginosus* (Li et al 1998). Informações sobre seqüências genéticas são ainda mais raras. A procura por novas fontes de GAs termoestáveis, bem como informações sobre a proteína e seu gene codificador são um campo aberto e com enormes perspectivas futuras.

Bibliografia

Akanuma, S.; Yamagishi, A.; Tanaka, N.; Oshima, T. *Protein science*, v.7, p. 698-705, 1998.

Aleshin, A.; Golubev, A.; Firsov, l. M.; Honzatko, R. B. *J. Biol. Chem*, v. 267, p. 19291-19298, 1992.

Aleshin, A. E.; Hoffman, C.; Firsov, l. M.; Honzatko, R. B. *J. Mol. Biol.*, V. 238, p. 575-591, 1994a.

Arnold, F.H.; Volkov, A. A. *Current opinion in chemical biology*, v. 3, p. 54-59, 1999.

Arnold, F. H. *Chemical engineering science*, v. 51, n. 23, p. 5091-5102, 1996.

Brandani, W;. Peralta, R.M. *Can. J. Microbiol.* v. 44, p. 493-497, 1998.

Bonifacino, J. S.; Klausner, R. D. *Celular proteolytic systems.*, A. Ciechanover and a. L. Schwartz, eds (wiley – liss, new york), v.15, p. 137 – 160, 1994.

Brumm, p. J. *Cereal food world*, v. 43, p. 804 – 807, 1998.

Buisson, G.; Duwe, E.; Haser, R.; Payan, F. *Embo J.*, V. 6, p. 3909-3916, 1987.

Carrea, G.; Colombo, G. *Tibtech*, v. 18, p. 401-402, 2000.

Chen, H-M., Ford, C., Reilly, P. J. *Biochem. J.*, V. 301, p. 275-281, 1994.

Chen, H. M.; Li, Y. X.; Panda, T.; Buehler, F.; Ford, C.; E reilly, P. J. *Protein engineering*, v. 9, n. 6, p. 499-505, 1996.

Chen, R. *Trends biotechnology*, v. 17, p. 344-345, 1999.

Chen, R. *Trends biotechnology*, v. 19, p. 13-14, 2001.

Christians, F. C.; Scapozza, l.; Crameri, A.; Folkers, G.; Stemmer, W. P. C. *Nature biotechnology*, v. 17, p. 259-264, 1999.

Coutinho, P. M.; Reilly, P. J. *Protein. Eng.*, V. 7, p. 393-400, 1994a.

Coutinho, P. M.; Reilly, P. J. *Protein. Eng.*, V. 7, p. 749-760, 1994b.

Coutinho, P. M.; Reilly, P. J. *Proteins*, v. 29, p. 334-347, 1997.

Crameri, A.; Raillard, S-A.; Bermudez, E.; Stemmer, W. P. C. *Nature*, v. 391, p.288-291, 1998.

Evans, R.; Ford, C.; Sierks, m.; Nikolov,

Z.; Svensson, B. *Gene*, v. 91, p. 131-134, 1990.

Fang. T.; Honzakto. R.B.: Reilly, P.J.; Ford, C. Protein Eng. v. 11, p. 127-133, 1998.

Fierobe, H.P; Mirgorodskaya, E; Frandsen, T.P; Roepstorff, P; Svensson, B. *Protein Expr. Purif.* V. 9, p. 159-170, 1997.

Fleetwood, J. D.; Weigel, J., *Nature*, v. 196, p. 984, 1962.

Flory, N.M. Ms Thesis. Department of Chemical Engineering. Iowa State University. Ames, Iowa. 1993.

Ford, C. *Curr. Opin. Biotechnol.* v. 10, p. 353-357, 1999.

Gaut, J. R.; Hendershot, l. M., *Curr. Opin. Cell biol*, v. 5, p. 589 –595, 1993.

Goto, M.; Seminaru, T.; Furukawa, K.; Hayashida, S., *Aplli. Env. Microbiol.*, V. 60, p. 3926-3930, 1994.

Harris, E. M. S.; Aleshin, A. E.; Firsov, l. M.; Honsatko, R. B., *Biochem.*, V. 32, p. 1618-1626, 1993.

Hayashi, H.; Ying, l.; Singh, S.; Kaneko, S.; Nirasawa, S.; Shimonishi, T.; Kawata, Y.; Imoto. T.; Kitaoka, M. *J. Molecular catalysis b: enzimatic*, v. 11, p. 811-816, 2001.

Hayashida, S.; Kuroda, K.; Ohta, K.; Kuhara, S.; Fukuda, K.; Sakaki, Y. *Agric biol chem.*, V. 53, p. 923-929, 1989.

Innis, M.A.; Holland, M.J.; McCabe, P.C.; Cole, G.E.; Wittman, V.P.; Tal, R.; Watt, K.W.K.; Gelfand, D.M.; Holland, J.P.; Mead, J.H. *Science*, v. 228, p. 21-26, 1985.

Jaeger, K-E; Reets, T. M. *Current opinion in chemical biology*, v. 4, p. 68-73, 2000.

James, J.A.; lee, B.H. *Food mut. Press inc.* v. 21, p. 1-52, 1997.

Kikuchi, M.; Ohnishi, K.; Harayama, S. *Gene*, v. 236, p. 159-167, 1999.

Klein, C.; Schulz, G. E., *Journal of molecular biology.*, V. 217, p. 737-750, 1991.

Klesov, A. A.; Gerasimas, V. B., *Biokhin.*, V. 44, p. 1084-1092, 1979.

Kohno, M.; Enatsu, M.; Funatsu, J.; Yoshiizumi, M.; Kujimiya, W. *Journal of biotechnology*, v. 87, p. 203-210, 2001.

Lee, D. D.; Lee, Y. Y.; Reilly, P. J.; Collins, JR.; E. V; Tsao, G. Y., *Biotechnol. Bioen.*, V. 18, p. 253 – 267, 1976.

Lee, D. D.; Lee, g. K.; Reilly, P. J.; Lee, Y. Y., *Biotechnol. Bioen.*, V. 22, p. 1-17, 1980.

Lehman, M; Wyss, M. Cur. Opinion Biotetec. v. 12, p. 371-375, 2001

Lenders, J. P.; Crichton, R. R. *Biotechnol. Bioeng.*, V. 31, p. 267 – 277, 1988.

Li, Y.; Coutinho, P. M.; Ford, c. *Protein engineering*, v. 11, p. 661-667, 1998.

Li, D.C; Yang, Y.J; Peng, Y.L; Shen, C.Y. *Mycol. Res.* V. 102, p. 568-572, 1998.

Libby, C. B.; Cornett, C. A. G.; Reilly, P. J.; Ford, c. *Protein engineering*, v. 7, n. 9, p. 1109-1114, 1994.

Manjunath, P.; B. C. Shenoy; R. Raghavendra Rao. *J. Appl. Biochem.*, V. 5, p. 235 – 260, 1983.

Mikami, B.; Hehre, E. J.; Sato, M.; Katsube, Y.; Hirose, M.; Morita, Y.; Mozhaev, V. V., *Tibtech.*, v. 11, p. 88-95, 1993.

Miyazaki, K.; Arnold, F. H. *Journal of molecular evolution*, v. 49, p. 716-720, 1999.

Miyazaki, K.; Wintrode, P. L.; Graylin, R. A.; Rubingh, D. N.; Arnold, F. H. *Journal of molecular evolution*, v. 297, p. 1015-1026, 2000.

Mozhaev, V. V., Berezin, H. V., Martinek, K., *Crc crit. Rev. Biochem.*, V. 23, p. 235-281, 1988.

Munch, O.; Tritsch, D. *Biochim. Biophys. Acta.*, V. 1041, p. 111 – 116, 1990.

Neustroev, K. N., Valter, S. N., Timchenko, N. V., Firsov, l. M., Golubev, A. M., Khokhlov, s. E., 1993. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **30**, 115-120.

Nunberg, J. H.; Meade, J. H.; Cole, G.; Lawyer, E. C.; McCabe, P.; Schweickert, V.; Tal, R.; Wittman, V. P.; Flatgaard, J. E.; Innis, M. A. *Molec. Cell biol.*, V. 4, p. 2306-2315, 1984.

Pazur, J. H.; Kleppe, K. *Carbohydr. Res.*, V. 20, p. 83-96, 1971.

Pryer, N. K.; Wuestehube, l. J.; Schekman, R., *Annu. Rev. Biochem.*, 61, p. 471 – 516, 1992.

Reetz, M. T.; Jaeger, K-E. *Topics in current chemistry*, v. 200, p. 31-57, 1999.

Reetz, M. T.; Jaeger K-E. *Chem. Eur. J.*, V. 6, n. 3, p. 407-412, 2000.

Reetz, M. T.; Zonta, A.; Schimossek; Liebeton, K.; Jaeger, K-E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, V. , n. 24, p. 2830-2832, 1997.

Shenoy, B. C.; Appu Rao, A. G.; Raghavendra Rao, m. R., *J. Biosci.*, V. 6, p. 601-611, 1984.

Sauer, J.; Sigurskjold, B.W.; christensen, U.; Frandsen, T.P.; Mirgorodskaya, E.; Harrison, M.; Roepstorff, P.; Svensson, B. *Biochem. Biophys acta.*, V. 1543, p. 275-293, 2000

Sevcik, J.; Solovikova, A. Hostinova, E.; Gasperick, J. Wilson, K.S.; Dauter, Z. *Acta Crystallog. D. Biol. Crystallog.* v. 54, p. 854-866, 1998.

Sinitsyn, A. P.; Klibanov, A. M.; Klesov, A. A; Martinek, K., *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, V. 14, p. 236 – 242, 1978.

Sorimachi, K.; Jacks, A. J.; Le-Gal-Coeffet, M. F.; Williamson, G.; Archer, D. B.; Williamson, M. P., *J. Mol. Biol.*, V. 259, p. 970-987, 1996.

Southall, S.M.; Simpson, P.J.; Gilbert, H.J.; Williamson, M.P. *Febs Lett.* v. 447, p. 58-60, 1999.

Stemmer, W. P. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.*, V. 91, p. 10747-10751, 1994a.

Sun, l.; Petrounia, I. P.; Yagasaki, M.; Bandara, G.; Arnold, F. H. *Protein engineering*, v. 14, n. 9, p. 699-704, 2001.

Svensson, B.; Ottesen, M., *Carlsberg res. Commun.*, V. 46, p. 13-24, 1981.

Svensson, B., Larsen, K.; Svendsen, I. *Carlsberg res. Commun.*, V. 48, p. 517-527, 1983.

Svensson, B., Larsen, K. E gunnarson, A. *Eur. J biochem.*, V. 154, p. 497 – 502, 1986.

Svensson, B., Jespersen, H.; Sierks, M.R.; MaCgregor, E.A. *Bichem. J.* v. 264, p. 309-311, 1989.

Tosi, L.R.O; Terenzi, H.F; Jorge. J.A. *Can. J. Microbiol.* v. 39, p. 846-852, 1993.

Zhang, J.; Dawes, G.; Stemmer, W. P. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.*, V. 94, p. 4504-4509, 1997.

Williamson, G.; Belshaw, N. J.; Williamson, M. P., *Biochem. J.*, V. 282, p. 423-428, 1992a.

Yang, Y.; Jiang, l.; Zhu, l.; Wu, Y.; Yang, S. *J. Biotechnology*, v. 81, p. 113-118, 2000.

Estudo da Produção de Ciclodextrina-Glicosil-Transferase (CGTase) Pela Linhagem Termofílica H69-3

Heloiza Ferreira Alves-Prado[1,2]; Gisele Rodrigues Cucolo[1]; Eleni Gomes[1,3] e Roberto DaSilva[1,4]

[1]Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – Universidade Estadual Paulista - Campus de São José do Rio Preto (Unesp/IBILCE); [2]Universidade Estadual Paulista – Campus de Rio Claro (Unesp/IB); [3]Depto. de Biologia; [4]Depto. de Química e Geociências.

Rua Cristóvão Colombo, 2265 – 15054-000 – São José do Rio Preto, SP. E-mail: heloiza@bio.ibilce.unesp.br

RESUMO

A ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase, E.C. 2.4.1.19) é uma enzima microbiana capaz de converter amido em ciclodextrinas, um produto de grande potencial para aplicação industrial. No presente trabalho, foi estudada a produção de CGTase pela linhagem termofílica H69-3 em diferentes meios, tanto em fermentação submersa (FS) como em fermentação com substrato sólido (FSS) a 45°C. A atividade para CGTase foi determinada pelos métodos dextrinizante e CD-fenolftaleina. Nos testes de fermentação submersa foram testados 11 diferentes substratos sem peptona e extrato de levedura, também foram analisadas 6 diferentes fontes de amido mantendo as concentrações de peptona e extrato de levedura. Nos ensaios de fermentação em substrato sólido, 9 diferentes tipos de substratos foram testados. Das diferentes fermentações analisadas a que melhor induziu a atividade CGTase foi a fermentação submersa na presença de peptona e extrato de levedura.

INTRODUÇÃO

A ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase; EC 2.4.1.19) é uma enzima microbiana capaz de converter o amido em ciclodextrinas por reações de ciclização, acoplamento e desproporcionação (Bender, 1986; Tonkova, 1998). As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos não redutores compostos principalmente por 6, 7 e 8 unidades de glicose, as quais são denominadas de α-, β- e γ- CDs, respectivamente. Elas apresentam uma cavidade interna hidrofóbica e a região externa hidrofílica. Tal característica favorece sua interação com uma variedade de substâncias, formando complexos de inclusões que alteram as características físicas e químicas da molécula hóspede. Essa propriedade das CDs tem levado a um aumento em sua aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticos, produtos agroquímicos, química, plásticos e outras (Allegre e Deratani, 1994; Bender, 1986, Szejtli, 1997). Desde a descoberta da CGTase vários microorganismos foram descritos como produtores da mesma, havendo predomínio do gênero *Bacillus*, mas outros gêneros já foram caracterizados como produtores de CGTase, no entanto ainda não há nenhum relato a partir de leveduras e fungos (Alves-Prado *et al*, 2002a). No Brasil, foram relatados *B. lentus* (Sabioni e Park, 1992), *B. circulans* n°76 (Salva *et al.*, 1997), *B. firmus* n°37 e linhagem n°41 (Matioli *et al.*, 1998), *Bacillus* sp subgrupo *alkalophilus* (Alves-Prado *et al*, 2002b).

O fator que mais limita a ampliação do uso industrial das CDs é ainda considerado, o elevado custo de produção das mesmas, devido ao também elevado custo das CGTases usadas no processo. Assim, pesquisas dirigidas para a produção de CGTases de menor custo são importantes para viabilizar economicamente o uso das CDs em escala comercial. Assim, o presente trabalho teve por objetivo analisar a produção de CGTase a partir de uma nova

linhagem termofílica isolada de amostras de solo da região de São José do Rio Preto, SP, visando a produção de CGTase em substratos de baixo custo.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

O microrganismo analisado no presente estudo faz parte da coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (Unesp/IBILCE) e foi isolado de amostras de solo de cultivo de mandioca, na região de São José do Rio Preto, SP (Alves-Prado *et al*, 2002a). O microrganismo foi identificado com a numeração H69-3.

Pré inoculo

O pré inoculo foi cultivado em meio de cultivo, descrito por Nakamura e Horikoshi (1976a) composto por: 10,0 g/L amido solúvel; 5,0 g/L peptona; 5,0 g/L extrato de levedura; 1,0 g/L K_2HPO_4; 0,2 g/L $MgSO_4.7H_2O$; 5,0 g/L Na_2CO_3 (esterilizado separadamente e adicionado ao meio após atingir a temperatura 60°C), pH 9,6. Frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio de cultivo foram inoculados com a massa microbiana proveniente de um tubo com ágar inclinado. O crescimento microbiano se deu em shaker sob agitação de 150 rpm, a 45°C por 24 horas.

Fermentação submersa

A fermentação submersa foi analisada de duas formas, tendo como base o meio de cultivo descrito acima. Inicialmente, excluiu-se do meio de cultivo a peptona e o extrato de levedura e substituiu-se o amido solúvel pelas seguintes fontes de carbono a 10,0 g/L: farelo de mandioca, amido de milho, polvilho, fubá, farelo de trigo, farelo de soja, extrato de soja, soja e farinha de soja. No segundo ensaio, manteve-se a mesma concentração do meio de cultivo substituindo-se o amido solúvel por: amido de batata-doce, amido de milho, amido de mandioca (polvilho doce), farelo de mandioca e fubá. Para ambos os meios analisados utilizou-se como controle de produção enzimática o meio de cultivo proposto por Nakamura e Horikoshi (1976a).

A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio de cultivo, os quais receberam 0,5 mL do pré inoculo de 24 horas. O crescimento microbiano foi a 45°C sob agitação de 150 rpm. Ao final da fermentação o volume total de cada frasco Erlenmeyer foi centrifugado a 10000xg a 5°C por 15 minutos. O sobrenadante livre de células foi utilizado para determinação das atividades enzimáticas Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

Fermentação em estado sólido

Para a fermentação em estado sólido foram empregados diferentes substratos: farelo de trigo, farelo de soja, farinha de soja, fubá, farelo de mandioca, polvilho doce, amido de milho e amido solúvel. Estudos anteriores (Alves-Prado *et al*, 2002b) revelaram que a mistura dos substratos com o farelo de trigo proporcionaram melhores rendimentos, assim, foi realizada a mistura na proporção de 1:1 dos substratos com farelo de trigo. Os meios foram preparados em frascos Erlenmeyers de 250 mL com um total de 5,0 g de material sólido. Após esterilização o material sólido foi inoculado com 2,5 mL do pré inoculo e 2,5 mL de solução Na_2CO_3 a 0,5%. Nestas condições, a umidade final nos frascos Erlenmeyers no início dos experimentos foi de 70%. Os frascos foram incubados em estufa a 45°C e de acordo com informações da literatura, as amostras da fermentação em meio sólido foram retiradas apenas no tempo de 72 horas (Dias *et al.*, 1992, Ramakrishna *et al.*, 1994; Alves-Prado *et al*, 2002b).

Após o crescimento, detectado visualmente e pelo odor típico da fermentação, a enzima foi extraída pela adição de 20 mL de água destilada aos meios sólidos que foram rompidos suavemente com bastão de vidro e, em seguida, mantidos a uma agitação de 100 rpm durante uma hora à temperatura ambiente. A suspensão foi filtrada a vácuo e em seguida centrifugada a 10000xg a 5°C por 15 minutos. As atividades enzimáticas foram determinadas no sobrenadante. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

Determinação das atividades enzimáticas

Foram utilizados dois métodos de análise de atividade da CGTase, pois a formação das CDs envolve a dextrinização e a ciclização. O método com iodo acompanha a dextrinização e o método com fenolftaleína é específico para a ciclodextrina já formada.

Método dextrinizante.

Foi baseado no descrito por Pongsawasdi e Yagisawa (1987), e Fuwa (1954) com algumas modificações (Alves-Prado *et al*, 2002b), onde foi observada a ação hidrolítica da CGTase, pela redução de coloração, apresentada pelo complexo iodo-amido. Foi utilizado amido solúvel a 0,5% como substrato e a redução de cor foi determinada a 700 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para reduzir em 10% a intensidade da cor azul do complexo Iodo-amido por minuto.

Método CD-fenolftaleína.

Foi baseado no descrito por Mäkelä *et al.* (1988) com algumas modificações (Alves-Prado *et al*, 2002b), tendo como base a formação do complexo β-ciclodextrina-fenolftaleína. Foi utilizado maltodextrina a 1,0% como substrato. A absorbância foi determinada em 550 nm. Uma unidade de atividade enzimática fenolftaleína, foi definida como a quantidade de enzima, necessária para produzir 1 µmol de β-ciclodextrina, por minuto.

Atividade xilanase

A atividade de xilanase foi determinada pela quantificação de açúcares redutores liberados na reação, de acordo com Miller (1959). Assim, 0,1 mL da enzima foi adicionado a 0,9 mL de solução de xilana 'birchwood' (Sigma), a 0,5% (p/v), em tampão acetato, 0,1 M, pH 5,6. Após incubação, a 55°C, por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 1,0 mL do reagente DNS. O controle recebeu a solução de enzima somente após a adição do reagente DNS. A absorbância foi determinada a 540 nm, em espectrofotômetro. Uma unidade de atividade xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de açúcar redutor, por minuto, sob as condições de reação.

Atividade protease

Para a atividade de protease foi preparada uma mistura de reação onde, 0,2 mL da enzima foi adicionada a 0,8 mL de solução de caseína, a 1,0% (p/v), em tampão acetato, 50 mM, pH 5,6. Após incubação, a 37°C, por 60 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 1,0 mL de TCA a 10%. Em seguida, a mistura de reação foi centrifugada por 5 minutos a 6000xg e determinada a absorbância do sobrenadante a 280 nm. O controle recebeu a solução de enzima somente após a adição da solução de TCA. Uma unidade de atividade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de tirosina, por minuto, sob as condições de reação.

Determinação da proteína

A quantidade de proteína foi estimada de acordo com o método Hartree-Lowry, usando a soro albumina bovina (BSA) como padrão (Hartree, 1972).

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A linhagem em estudo apresentou crescimento microbiano em todos os meios analisados, porém apresentou diferentes valores para a produção de CGTase. Foi determinada, a atividade de xilanase, pois esta é uma enzima de interesse do laboratório. Porém a linhagem termofílica H69-3 não apresentou produção de xilanase em nenhum dos meios analisados.

Fermentação submersa

A fermentação submersa foi analisada por duas diferentes composições de meio de cultivo. Inicialmente foi analisado um meio sem a presença de peptona e extrato de levedura e com diferentes substratos. Foi observado que o microrganismo apresentou um tempo de crescimento mais lento em relação ao controle, no qual após 48 horas de fermentação já apresentava uma produção significativa de CGTase. A ausência de peptona e extrato de levedura no meio de cultivo, após 48 horas de fermentação, ainda não havia produção significativa de biomassa em nenhum meio. Diante disso, a fermentação foi prolongada até 96 horas de cultivo. Os resultados obtidos para essa fermentação estão ilustrados na figura 1.

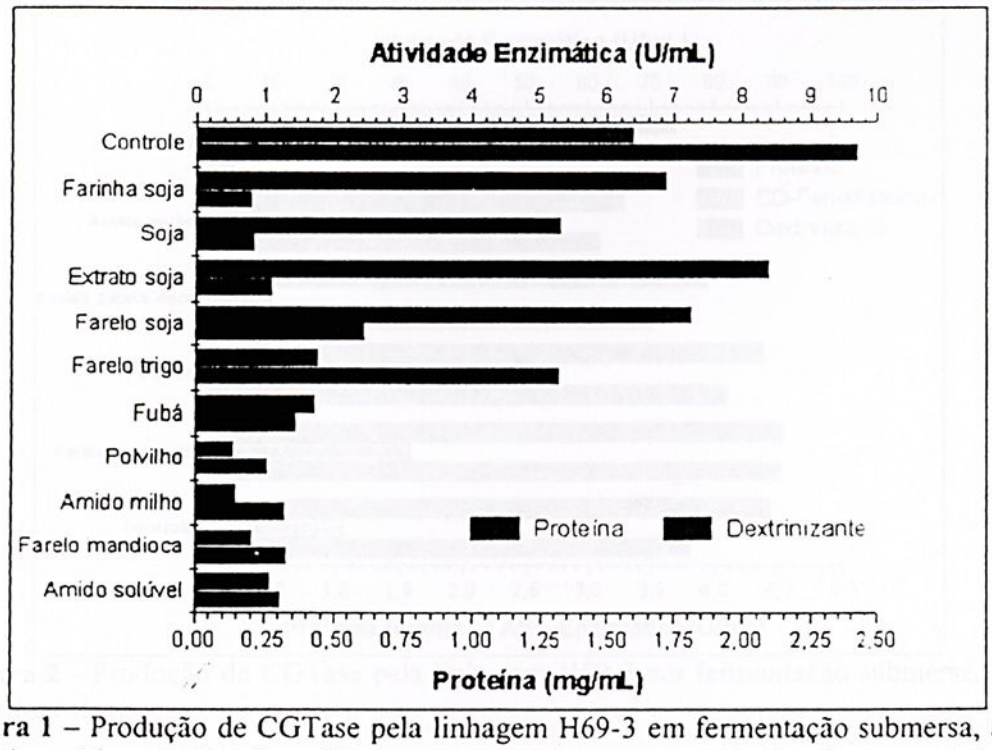


Figura 1 – Produção de CGTase pela linhagem H69-3 em fermentação submersa, após 96 horas de cultivo. Meio de cultivo sem peptona e extrato de levedura; controle: meio Nakamura e Horikoshi (1976a).

De acordo com a figura 1, a produção de CGTase foi baixa se comparada com o meio controle. O meio contendo farelo de trigo foi o que apresentou produção de CGTase mais significativa, seguido do meio com farelo de soja. A atividade da CGTase pelo método CD-fenolftaleína, não foi detectada, provavelmente devido à baixa atividade da enzima. Diante do resultados, pode-se inferir que peptona e extrato de levedura são nutrientes importantes para favorecer o crescimento microbiano e da mesma forma importantes par estimular a produção de CGTase. É provável que, o fornecimento de nitrogênio e aminoácidos pelos substratos analisados não foi suficiente para favorecer o crescimento pleno da linhagem H69-3.

Já no segundo experimento, onde variou-se apenas a fonte de amido mantendo-se as concentrações usuais de peptona e extrato de levedura, o crescimento microbiano foi pleno.

apresentando boa produção de CGTase. A figura 2 ilustra os resultados obtidos para essa fermentação. Observa-se que foi possível a determinação da atividade CGTase pelos dois métodos de atividade. A produção de CGTase foi mais significativa para o meio contendo farelo de mandioca como substrato. O meio contendo amido de mandioca (polvilho doce) também apresentou atividade significativa, sendo superior à apresentada pelo controle. Essas duas fontes de amido tem a mesma origem vegetal, a mandioca que por sua vez era a cultura cultivada no solo de onde foi isolado o microrganismo. Assim, a fonte de amido presente no local de isolamento microbiano, pode ser um bom substrato para estimular a produção enzimática, pelo microrganismo.

Os demais substratos apresentaram produção de CGTase inferior ao controle, mas foram superiores as atividades apresentadas pelos primeiros meios analisados (figura 2). Tal resultado, vem corroborar a importância nutricional dada pelo extrato de levedura e peptona para o crescimento desse microrganismo, sob fermentação submersa. O teor de proteína solúvel encontrado nos diferentes meios, após a fermentação, parece estar relacionado com a atividade da CGTase, apenas o ensaio com o fubá foi uma exceção.

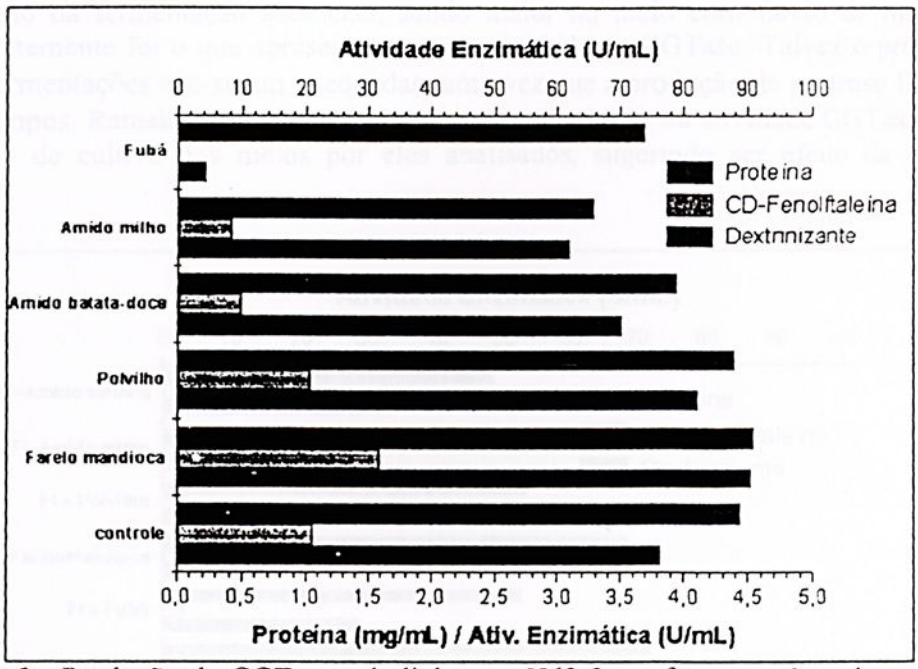


Figura 2 - Produção de CGTase pela linhagem H69-3 em fermentação submersa, após 48 horas de cultivo.

Fermentação em estado sólido

É conhecido que nas formulações de meios de cultura o uso das tradicionais fontes de carbono (C) e nitrogênio (N) comerciais, acarretam um custo consideravelmente elevado na produção industrial de enzimas (Bailey e Ollis, 1986; Damaso *et al.* 2000; Dias *et al.*, 1992; Raimbault, 1998; Alves-Prado *et al*, 2002b). Assim, pesquisas dirigidas à produção de enzimas utilizando resíduos agro-industriais de baixo custo, visando a substituição das fontes convencionais de C e N são importantes para a viabilizar economicamente o uso das enzimas em escala comercial (Raimbault, 1998; Damaso *et al.* 2000). Alguns substratos de baixo custo e de fácil obtenção foram testados na formulação de um meio sólido de produção de CGTase, como alternativa a um dos meios reconhecidamente de maior produção da CGTase descrito na literatura (Nakamura e Horikoshi, 1976a, Nakamura e Horikoshi, 1976b; Tonkova, 1998), porém de custo alto. Foram analisados 9 diferentes formulações de meio com substrato sólido. em todas elas houve crescimento microbiano. Apenas no meio composto por farelo de trigo +

farelo de soja a produção de CGTase foi semelhante aos níveis obtidos na fermentação submersa. Os demais meios apresentaram atividades inferiores a esse meio. Na figura 3 pode-se observar ainda que, quando o microrganismo foi cultivado apenas em farelo de trigo ou apenas em farelo de soja, a produção de CGTase foi a metade da apresentada quando os dois substratos foram misturados. Assim, pode-se inferir que alguns dos nutrientes do farelo de trigo ou do farelo de soja não puderam ser disponibilizados sozinhos, esses tornaram-se acessíveis ao microrganismo quando foram misturados. São relatados poucos estudos com a produção de CGTase em substrato sólido, provavelmente em virtude de os principais microrganismos produtores de CGTase pertencer ao gênero *Bacillus* e a fermentação em estado sólido ser mais favorável aos fungos filamentosos. Mesmo assim, Ramakrishna *et al* (1993) e Alves-Prado *et al* (2002b) obtiveram atividades da CGTase sob fermentação em estado sólido semelhantes às obtidas em fermentação submersa utilizando *Bacillus cereus* e *Bacillus* sp subgrupo *alkalophilus* mesofílicos, respectivamente.

A atividade de protease foi analisada em todas as formulações de meio estudadas nesse trabalho e foi detectada em quase todos os meios sólidos, provavelmente em virtude do alto teor de proteína disponível neste meios. Também houve atividade proteolítica na segunda formulação da fermentação submersa, sendo maior no meio com farelo de mandioca que coincidentemente foi o que apresentou maior atividade de CGTase. Talvez o prolongamento dessas fermentações não sejam adequadas, uma vez que a produção de protease foi detectada, nestes tempos. Ramakrishna *et al* (1993) observou a redução da atividade CGTase em relação ao tempo de cultivo nos meios por eles analisados, sugerindo ser efeito da presença de proteases.

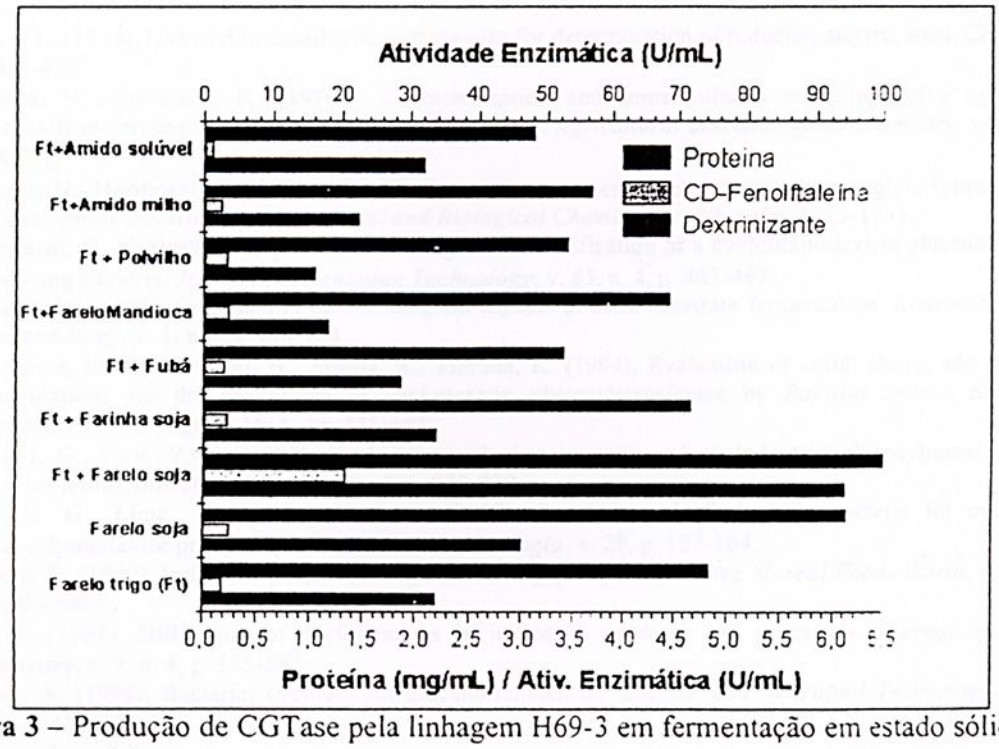


Figura 3 – Produção de CGTase pela linhagem H69-3 em fermentação em estado sólido, após 72 horas de cultivo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allegre, M., Deratani, A. (1994), Cyclodextrin uses: from concept to industrial reality. *Agroo Food Industry Hi Tech.*, p.9-17.

Alves-Prado, H. F. (2002a), Estudo da produção de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) por *Bacillus* sp alcalofílico. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual Paulista (IB-RC), Rio Claro, Brasil.

Alves-Prado, H. F.; Gomes, E. e DaSilva R. (2002b), Seleção de microrganismos produtores de ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), produção e caracterização da enzima. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.5, p. 189-196.

Bailey, J. E., Ollis, D. F. (1986), Biochemical engineering fundamentals. 2nd Ed. New York: McGraw-Hill International Editions.

Bender, H. (1986), Production, Characterization, and application of cyclodextrins. *Advances in Biotechnological Processes*, v. 6, p. 31-71.

Damaso, M. C. T; Andrade, C. M. .M. C., Pereira Jr, N. (2000), Use of corncob for endoxylanase production by thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* 1OOC-4145. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84, p. 821-834.

Dias, A. A. M; Andrade, C. M. .M. C., Linardi, V. R. (1992), Production of amylases by Candida in liquid and semisolid fermentation. *Revista de Microbiologia*, v. 23, p. 189-193.

Hartree, E. F. (1972), Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric responce. *Anal. Biochem.*, v. 48, p. 422-427.

Fuwa, H. A. (1954), A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amilose as the substrate. *Journal of Biochemistry.*, v. 41, p. 583-603.

Mäkelä, M. J.; Korpela, T. K.; Puisto, J., Laakso, S. V. (1988), Nonchromatographic cyclodextrin assays: evaluation of sensitivity, and conversion mixture applications. *Journal Agric. Food Chemistry*, v.36, p. 83-88.

Matioli, G.; Zanin, G. M.; Guimarães, M. F., Moraes, F. F. (1998), Production and purification of CGTase of alkalophilic *Bacillus* isolated from Brazilian soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70-72, p. 267-275.

Miller, G.L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428.

Nakamura, N., Horikoshi, K. (1976a), Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.40, n. 4, p. 753-757.

Nakamura, N., Horikoshi, K. (1976b), Purification and properties of neutral-cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 40, n. 9p. 1785-1791.

Pongsawasdi, P., Yagisawa, M. (1987), Screening and indentification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. *Journal Fermentation Technology*, v. 65, n. 4, p. 463-467.

Raimbault, M. (1998), General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Eletronic Journal of Biotechnology*, v. 1, n.3, p. 174-188.

Ramakrishna, S. V.; Saswathi, N.; Sheela, R., Jamuna, R. (1994), Evaluation of solid, slurry, and submerged fermentations for the production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Bacillus cereus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16, n. 5p. 441-444.

Sabioni, J. G., Park, Y. K. (1992), Production and characterzation of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus lentus*. *Starch/Stärke*, v. 44, n. 6, p. 225-229.

Salva,T. J. G.; Lima, V. B., Pagan, A. P. (1997), Screening of alkalophilic bacteria for cyclodextrin glycosyltransferase production. *Revista de Microbiologia*, v. 28, p. 157-164.

Starnes, R. L. (1990), Industrial potencial of cyclodextrin glycosyltransferases. *Cereal Foods World*, v. 35, n. 11, p. 1094-1099.

Szejtli, J. (1997), Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *Journal of Materials Chemistry*, v. 7, n. 4, p. 575-587.

Tonkova, A. (1998), Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, n. june, p. 678-686.

Perfil Enzimático produzido pelo Fungo Termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de Fermentação em Estado Sólido e Fracionamento de uma Poligalacturonase Termoestável

Eduardo da Silva Martins, Dênis Silva, Roberto da Silva, Eleni Gomes

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Cristóvão Colombo, 2265, cep 15054-000, São José do Rio Preto – SP. E-mail: edusmartins@hotmail.com

RESUMO

O conhecimento do "pool enzimático" produzido por um microrganismo é importante quando visa-se a aplicação industrial de uma determinada enzima, uma vez que alguns processos são favorecidos quando diferentes tipos de enzimas estão presentes numa mesma mistura, enquanto que outros requerem apenas um grupo enzimático específico. No presente trabalho foi estudada a produção de diversas enzimas hidrolíticas pelo fungo termofílico Thermoascus aurantiacus 179-5 e fracionada uma poligalacturonase. A maior produção das enzimas exo-poligalacturonase, endo-poligalacturonase e lignina-peroxidase ocorreu após 4 dias de fermentação, enquanto que a produção máxima de xilanase, carboximetilcelulase, avicelase, manganês-peroxidase e α-amilase ocorreu após 10 dias. Não houve produção de lacase, nas condições estudadas. No fracionamento da poligalacturonase, houve um pico da enzima, com atividade específica de 22,73 U/mg de proteína. A enzima mostrou uma alta estabilidade após ser submetida à liofilização e à passagem pela coluna cromatográfica, mantendo 56,5% da atividade da solução enzimática bruta.

INTRODUÇÃO

As pesquisas de produção de enzimas por microrganismos termofílicos têm crescido significativamente nos últimos anos (Holst *et al.*, 1997; Vieille e Zeikus, 2001). A atenção dos pesquisadores para esses microrganismos deve-se principalmente às características intrínsecas de suas enzimas, tais como a alta estabilidade à temperatura, ao pH e à agentes desnaturantes (Bruins *et al.*, 2001).

As enzimas dos termofílicos são geralmente mais termoestáveis, quando comparadas com as de mesofílicos e podem ser usadas em diversos processos industriais, desenvolvidos sob altas temperaturas. Sob o ponto de vista industrial, várias são as razões para a seleção e estudo de enzimas produzidas por microrganismos termofílicos, tais como (Bruins *et al.*, 2001; Lea *et al.*, 1998): apresentam alta estabilidade à temperatura e são geralmente mais resistentes à agentes detergentes e à enzimas proteolíticas; em altas temperaturas o risco de contaminação por microrganismos mesofílicos é menor e a viscosidade do substrato é reduzida, o que facilita o seu bombeamento, filtração e centrifugação.

As pectinases são enzimas que apresentam uma ampla aplicação industrial, atuando na extração e clarificação de sucos e na produção de vinhos e, na indústria têxtil, ajudando na liberação das fibras de celulose (Alkorta *et al.*, 1998).

O conhecimento do perfil enzimático, ou seja, do conjunto de enzimas que um microrganismo produz em determinado substrato, permite avaliar as potencialidades do preparado enzimático obtido. Dessa forma, é importante conhecer quais enzimas são produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, sob condições ótimas de produção de pectinase (Martins *et al.*, 2002).

MATERIAL E MÉTODOS

1- Microrganismo

Foi utilizado o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*, isolado de material vegetal em decomposição.

2- Meio para fermentação em estado sólido e obtenção das enzimas

A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer contendo 5 g de substrato composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja, na proporção de 30%/70% (p/p). Este foi inoculado com 5 mL de suspensão de massa micelial e hidratado com 7 mL de solução nutriente composta por 0,1% de NH_4NO_3, 0,1% de $MgSO_4$ x $7H_2O$ e 0,1% de $(NH_4)_2SO_4$ (umidade de 70%). O cultivo foi feito a 50°C, durante 4 e 10 dias.

3- Estudo do perfil enzimático

Foram determinadas as atividades das seguintes enzimas despolimerizantes na solução enzimática bruta obtida: exo-poligalacturonase, endo-poligalacturonase, xilanase, carboximetilcelulase, avicelase, α-amilase, lacase, manganês-peroxidase e lignina peroxidase.

4- Medida da atividade enzimática

4.1- Atividade de Poligalacturonase (PG)

A atividade de PG foi medida pelo método do DNS, proposto por Miller (1959). Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido galacturônico por minuto, nas condições de reação. Foi também utilizado o método viscosimétrico para avaliação de endo-PG. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade necessária para reduzir em 50% a viscosidade da solução, nas condições de ensaio.

4.2- Atividade de Xilanase, Avicelase e CMCase

A atividade enzimática da xilanase foi determinada pelo método do DNS. Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de xilose por minuto, nas condições de reação, utilizando curva padrão de xilose.

A atividade da avicelase foi determinada por procedimento idêntico ao da xilanase, exceto 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) a 0,5%. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade capaz de liberar 1 µmol de glicose por minuto, nas condições de reação, utilizando curva padrão de glicose.

4.3- Atividade de Amilase

A atividade de α-amilase (ou dextrinizante) foi determinada medindo-se a diminuição da capacidade de ligação amido-iodo de uma solução de amido. Uma unidade de enzima (U) foi

definida como a quantidade de enzima requerida para hidrolisar 10 mg de amido em 10 min., nas condições de ensaio.

4.4- Atividade de Ligninases

A atividade de lacase foi determinada usando 2,2"-azino-bis-etilbenthiazolina (ABTS) em1 ml de uma mistura contendo 0,1 ml de acetato de sódio 0,1M (pH 5,0), 0,8 ml de solução de ABTS a 0,3% (p/v) e 0,1 ml da solução de enzima bruta. A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de ABTS por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar para ABTS oxidado de $3,6 \times 10^4$/mol/cm.

A atividade de Manganês-peroxidase (Mn-P) na solução enzimática bruta foi determinada numa mistura de reação composta de 0,8 ml de tampão lactato de sódio a 0.05M (pH 4,5), 0,1 ml de solução de solução de $MnSO_4$ a 0,4M e 0,1 ml da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (40 µM) e a absorbância medida a 240 nm. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de Mn^{+3} por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de 8.1×10^3/mol/cm.

A atividade de Lignina-peroxidase (Lip) na solução enzimática bruta foi determinada numa mistura de reação composta de 0,8 ml de tampão fitalato ácido de potássio-HCl a 0,05M (pH 3,0), 0,1 ml de solução de solução de álcool veratrílico a 40 mM e 0,1 ml da solução de enzima bruta. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio (0,2 mM) e o aumento da absorbância, devido à oxidação do álcool veratrílico, medido a 310 nm. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de veratraldeído por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $9,3 \times 10^3$/mol/cm.

5- Fracionamento da poligalacturonase por filtração em gel Sephadex

A solução enzimática bruta foi dialisada em tampão TRIS-HCl 10 mM pH 7,5 a 4°C, overnight. O material dialisado foi congelado em Nitrogênio líquido e posteriormente liofilizado. A concentração foi feita pela ressuspensão do material liofilizado em tampão TRIS-HCl 50 mM pH 7,5.

A enzima bruta, concentrada e dialisada, foi submetida à cromatografia de filtração em gel em coluna contendo resina Sephadex G-75 (Pharmacia). Para a eluição foi usado tampão TRIS-HCl 50mM e pH 7,5. O fluxo foi de 24 mL por hora, sendo coletados 6 mL por tubo e a atividade de poligalacturonase foi determinada nas frações eluídas.

A determinação dos teores de proteínas totais da solução enzimática bruta e das frações purificadas foi feita através do método de Bradford (1976), usando soro albumina bovina como padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1- Estudo do perfil enzimático

Foram determinadas as atividades de exo-poligalacturonase, endo-poligalacturonase, xilanase, carboximetilcelulase, avicelase, lignina-peroxidase, manganês-peroxidase, lacase, e α-amilase, na solução enzimática bruta, após 4 e 10 dias de cultivo (Tabela 1).

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

Tabela 1: Perfil enzimático produzido pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* em meio composto por 30% de bagaço de cana-de-açúcar e 70% de bagaço de laranja.

Enzima	Atividade (U/g)	
	Tempo de fermentação	
	4 dias	10 dias
Exo-poligalacturonase	40,0	13,7
Endo-poligalacturonase	3,6	1,4
Xilanase	416,7	1288,8
Carboximetilcelulase	2000,0	6064,3
Avicelase	0	46,1
Lignina-peroxidase	2769,0	1371,2
Manganês-peroxidase	2354,0	2619,0
Lacase	0	0
α-amilase	1,8	25,6

A produção máxima de exo-poligalacturonase (40,0 U/g, o equivalente a 5,0 U/ml) foi superior à encontrada por Solís-Pereira *et al.* (1993), que relataram a produção de 33,0 U/g desta enzima pelo fungo *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido de meio contendo pectina sintética. Esta também foi maior que a relatada por Zengh e Shetty (2000), que obtiveram a produção máxima de 29,4 U/g com o fungo *Lentinus edodes* na fermentação de polpa de maçã e por Galiotou-Panayotou *et al.* (1997), que obtiveram 3,0 U/ml desta enzima por *Aspergillus niger*, através de fermentação submersa em meio contendo pectina de citrus. A produção máxima de endo-poligalacturonase foi de 3,6 U/g (equivalente a 0,45 U/ml) e coincidiu com o tempo de maior produção de exo-poligalacturonase (4 dias). A produção da endo-poligalacturonase foi inferior àquela obtida por outras linhagens microbianas relatadas na literatura. Soares *et al.* (2001) obtiveram cerca de 2,0 U/ml desta enzima, produzida por *Bacillus* sp, através de fermentação em estado sólido de farelo de trigo. Teixeira *et al.* (2000) relataram a produção desta enzima por *Aspergillus japonicus*, em meio contendo diferentes fontes de carbono. A produção máxima da endo-PG foi de 0,59 U/ml, em meio contendo pectina a 1,0% e glicerol a 0,2%.

O fungo *Thermoascus aurantiacus* apresentou alta produção de xilanase nas condições estudadas. Após 4 dias de fermentação a atividade foi de 416,7 U/g e, após 10 dias, este valor foi de 1288,8 U/g. Esta produção é superior à encontrada em alguns relatos na literatura sobre a produção desta enzima por diferentes linhagens deste fungo. Grajek (1987) relatou a produção de 96,7 U/g de xilanase por uma linhagem de *Thermoascus aurantiacus*, cultivado em substrato composto por polpa de beterraba. Alam *et al.* (1994) obtiveram 843,0 U/g desta enzima, produzida pela linhagem *Thermoascus aurantiacus* BJT 190, cultivada em farelo de trigo. Por outro lado, a produção de xilanase obtida em nossos experimentos é inferior à relatada por Kalogeris *et al.* (1998), utilizando a linhagem *Thermoascus aurantiacus* IMI 216529 na fermentação de diferentes resíduos agro-industriais. A produção máxima obtida foi

de 6193,0 U/g, em meio composto por farelo de trigo, suplementado com $(NH4)_2SO_4$ como fonte de nitrogênio.

O fungo também apresentou alta produção de carboximetilcelulase, nas condições estudadas, sendo que a produção máxima foi de 6064,3 U/g (equivalente a 758 U/ml), após 10 dias. Esta produção é muito superior à relatada por Bahkali (1995), que obteve cerca de 25,0 U/ml desta enzima, produzida por *Verticillium tricorpus*. Com relação à produção de avicelase, a atividade obtida em nossos experimentos (46,1 U/g, equivalente a 5,76 U/ml) é inferior à relatada pelo mesmo autor, que obteve cerca de 25,0 U/ml desta enzima pelo fungo *Verticillium tricorpus*.

Quanto à produção de ligninases, o fungo apresentou atividade de liginina-peroxidase e manganês-peroxidase e não foi detectada atividade de lacase, nas condições estudadas. A atividade máxima de manganês-peroxidase foi de 2619,0 U/g (equivalente a 346,0 U/ml), após 10 dias de fermentação. Segundo Nüske *et al.* (2002), a produção de manganês-peroxidase por *Nematoloma frowardii* foi de 1,5 U/ml, após 11 dias de fermentação em lascas de madeira como substrato. A produção desta enzima pelo fungo *Thermoscus aurantiacus* também é muito superior à relatada para o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, que produziu 1,3 U/ml desta enzima em fermentação de farelo de trigo (Fujian *et al.*, 2001).

Com relação à lignina-peroxidase, a produção máxima foi de 2769,0 U/g (327,0 U/ml), após 10 dias, muito superior à relatada por Fujian *et al.* (2001), que obtiveram produção de 2,7 U/ml desta enzima por *Phanerochaete chrysosporium*.

A atividade máxima de α-amilase foi obtida após 10 dias de fermentação (25,6 U/g). Esta produção é inferior à relatada por Rabalho (2002), que obteve 40,8 U/g desta enzima pela linhagem *Mucor* sp A13-36 em fermentação submersa de meio nutriente com resíduo de mandioca. No entanto, o fungo *Thermoascus aurantiacus* apresentou significativa produção desta enzima nas condições estudadas, principalmente levando-se em consideração o fato de que o substrato utilizado, composto por bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja, não contém derivados de amido indutores de amilase, o que sugere a produção de amilase constitutiva.

A produção de pectinases, xilanase, carboximetilcelulase, α-amilase e ligninases apresentada pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* no presente trabalho 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.

2- Fracionamento da poligalacturonase

No fracionamento da poligalacturonase, foi conseguida uma boa recuperação da enzima (56,5%) após esta ter sido submetida à liofilização e à passagem pela coluna de cromatografia de filtração em gel. Conforme pode ser visto na figura 1, houve apenas um pico da poligalacturonase fracionada, o qual ocorreu no volume de eluição entre 204 ml e 294 ml.

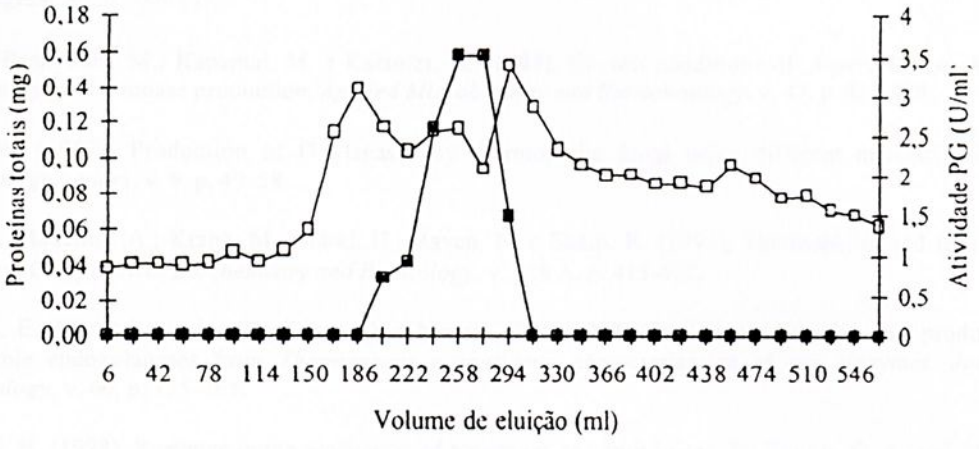


Figura 1: Fracionamento da poligalacturonase produzida por *Thermoascus aurantiacus* em cromatografia de filtração em gel. - □- Proteínas totais; -⊹- Atividade PG.

CONCLUSÕES

- O fungo *Thermoascus aurantiacus* apresentou uma boa produção das enzimas exo-poligalacturonase, xilanase, carboximetilcelulase, lignina-peroxidase, manganês-peroxidase e α-amilase, o que demonstra o grande potencial biotecnológico deste microrganismo na produção de diversas enzimas com potencial de uso industrial.

- No fracionamento da exo-poligalacturonase houve apenas um pico da enzima, sendo que esta mostrou uma boa estabilidade à liofilização e à passagem pela coluna de cromatografia de filtração em gel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alam, M.; Gomes, I.; Mohluddin, G. e Hoq, M. M . (1994), Production and characterization of thermostable xylanases by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocelluloses. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16, p. 298-302.

Alkorta, I.; Garbisu, C.; Llama, M. e Serra, M. J. (1998), Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, v. 33, p. 21-28.

Bahkali, A. H. (1995), Production of cellulase, xylanase and polygalacturonase by *Verticillium tricorpus* on different substrates. *Bioresource Technology*, v. 51, p. 171-174.

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

Bruins, M. E.; Janssen, A. E. M. e Boom, R. M. (2001), Thermozymes and their applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 90, p. 155-189.

Fujian, X.; Hongzhang, C. e Zuohu, L. (2001), Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. *Bioresource Technology*, v. 80, p. 149-151.

Galiotou-Panayotou, M.; Kapantai, M. e Kalantzi, O. (1997), Growth conditions of *Aspergillus* sp ATHUM-3482 for polygalacturonase production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 47, p. 425-429.

Grajek, W. (1987), Production of D-xylanases by thermophilic fungi using different methods of culture. *Biotechnology Letters*, v. 9, p. 49-58.

Holst, O.; Manelius, A.; Krahe, M.; Märkl, H.; Raven, N. e Sharp, R. (1997), Thermophiles and fermentation technology. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 118 A, p. 415-422.

Kalogeris, E.; Christakopoulos, P.; Kekos, D. e Macris, B. J. (1998), Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: characterization of two isozymes. *Journal of Biotechnology*, v. 60, p. 155-163.

Lea, A. G. H. (1998), Enzymes in the production of beverages and fruit juices. In: Tucker, G. A. and Woods, L. F. J. Enzymes in Food Processing, sec. Ed, Backie Academic & Professional, Glasgow, p. 223-247.

Martins, E. S.; Silva, D.; Da Silva, R. e Gomes, E. (2002), Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 949-954.

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

Nüske, J.; Scheibner, K.; Dornberger, U.; Ullrich, R. e Hofrichter, M. (2002), Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 30, p. 556-561.

Rabalho, A. A. (2002), Isolamento de linhagens microbianas amilolíticas termofílicas: produção, caracterização e aplicação da enzima bruta na hidrólise do amido de mandioca. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, Brasil.

Soares, M. M. C. N.; Da Silva, R.; Carmona, E. C. e Gomes, E. (2001), Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 17, p. 79-82.

Solís-Pereira, S.; Favela-Torres, E.; Viniegra-González, G. e Gutiérrez-Rojas, M. (1993), Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 39, p. 36-41.

Teixeira, M. F. S.; Filho, J. L. L. e Durán, N. (2000), Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 286-290.

Vieille, C. e Zeikus, G. J. (2001), Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, p. 1-43.

Zengh, Z. e Shetty, K. (2000), Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 825-830.

SCREENING OF THERMOPHILIC MICROBIAL STRAINS FOR THERMOPHILIC AMYLASE PRODUCTION

A.A. Rabalho, C.M. Landi Franco, R. Da Silva, E. Gomes*

Laboratório de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

*Mailing address: ELENI GOMES, Laboratório de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (UNESP).
Rua Cristovão Colombo, 2265-Jd Nazareth
CEP: 15054-000- São José do Rio Preto- SP, Brasil
e-mail: eleni@bio.ibilce.unesp.br

Samples of agricultural soil, tuberous root, compost pile, and animal manure and scalding water from a plucking machine of a chicken abattoir were investigate with respect to the isolation of thermophilic microorganism able to produce amylase and glucoamylase. 339 thermophilic microorganism strains (326 bacteria, and 13 fungi) were isolated from 20 collecting which were able to grow on a medium starch as the only carbon source. The most of strains (89.6%) produced α-amylase, when they are cultivated on wheat bran. The presence of glucoamylase activity was less frequent in submerged fermentation than that observed i solid-state fermentation (55.5%). Among the strains studied 07 bacteria (Bacillus sp A4.1b, Bacillus sp A4.4-i, Bacillus sp A4.5-2, Bacillus sp A4.7-1, Bacillus sp A13-8, Bacillus sp A4.4-f and Kurthia gibsoni A11-4) present the highest productions of α-amylase activities. Cassava pulp was a good alternative substrate for amylase production by these strains. Amylase produced by Bacillus A4.$_1$-f and Bacillus A4$_4$-b presented optimum activity at pH 6.5. The optimum temperature for enzyme Bacillus A4$_4$-f was determined to be around 55-

70°C and that one produced by Bacillus A4₁-b presented maximum activity at 65°C. When maintained for 2h at 70°C, at 50% of original these amylolytic activities was retained and 30% at 80°C. α-amylase produced by Bacillus A 4₄-f presented 100% of initial activity after 2h at 50°C, 50% at 65°C and 10% at 80°C, after 2h.

Enzymatic hydrolysis of starch involves five groups of amylases. The endoamylases (EC 3.2.1.1) cleave only the α-1,4 glycoside bonds in amylose, amylopectin and related polysaccharides releasing oligosaccharides of various lengths (Janecek 1997). With regard to exoamylases, currently two types of them are important in starch hydrolysis. The glucogenic exoamylase (Glucoamylase EC 3.2.1.3) is generally from fungal origin and attacks α-1,4 linkages from the nonreducing end releasing glucose molecules and may also hydrolyses the α-1,6 bonds but much more slowly than the α-1.4. The maltogenic exoamylase (β-amylase EC 3.2.1.2) is generally of plant origin,. However its existence as an extracellular enzyme in *Bacillus, Clostridium* and *Pseudomonas* genus has been established. β-amylase acts on the α-1,4 bonds from the nonreducing ends of outer starch chains or related polysaccharides by gradual removal of maltose units (Guzmán-Maldonato and Paredes-López 1995). Debranching enzymes comprise the pullulanase (EC 3.2.1.41) with specific action on α-1,6 linkages in pullulan releasing products varying from 115 to 2300 glucose residues and isoamylase (EC 3.2.1.68) that hydrolyses α-1,6 glycosidic linkages in amylopectin. Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase EC 2.4.1.19) is an enzyme capable of hydrolyzing starch to a series of nonreducing cyclomaltooligosaccharides referred to as cyclodextrins (Vihinen and Mäntsälã 1989).

Thermophilic organisms grow optimally between 60 and 80°C and they don't act well bellow 40°C (Vielli *et al.* 1996). Thermophilic and hyperthermophilic enzymes, witch are intrinsically stable and active at high temperature, offer major biotechnological advantages than mesophilic or psychrophilic enzymes. The most important advantages are: once expressed in mesophilic host, these enzymes are easier to purify by a treatment; their thermostability is associated with a higher resistance to chemical denaturants (such as a solvent or guanidium hydrochloride); performing enzymatic reactions a high temperature allow higher substrate concentrations, lower viscosity, fewer risks of microbial contaminations and higher reactions rates (Vielle and Zeikus 2001).

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

Amylolytic enzymes with high levels of the thermostability have technological importance in the production of sweeteners from starch. Elevated temperatures are required in the several steps of this process due to poor stability of starch at low temperatures.

In this study it was presented data on the screening for the presence of amylase activity in strains of thermophilic bacteria and fungi isolated from different materials. The effect of the carbon source on α-amylase and glucoamylasse production by these microorganisms was examined, as well as characteristics of some α-amylases were presented.

Material and Methods

Isolation of the microorganisms: 2g of samples from agricultural soil, tuberous root, compost pile, and animal manure, and 2 ml of scalding water from a plucking machine of a chicken abattoir were pooled and homogenized in sterile medium containing 1.0% of soluble starch; 0.14% of $(NH_4)_2SO_4$; 0.20% K_2HPO_4; 0.02% of $MgSO_4.7H_2O$; 1.4mg/L $ZnSO_4.7H_2O$; 2.0 mg/L $CoCl_2$), pH 5.0. The mixture was incubated at 55°C for 24 h and after, a loop of the homogenized one was then streaked onto the same medium, containing agar 3.0% and incubate at 55°C for 72 h. All morphological contrasting colonies were purified by repeated streaking. Pure cultures were sub-cultured onto slants media for identification and enzymes studies. The genus identification was based on morphological and biochemical characteristics. (Holt *et al.*1994).

Plate assay of starch depolimerizing: The medium was the same used for the isolation. Pure culture was inoculated by puncturing on the medium and incubated for 24-48 h at 55°C. When the colonies reached around 2.0 mm, iodine-potassium solution (iodine 0.03% and potassium iodine 0.3%) was pored for detecting clearance zones.

Production of amylases on solid-state (SSF) and submerged fermentation (SmF):

Strains whose colonies presented largest clearing zones were used for enzyme production assay on liquid and solid medium.

For SmF the carbon source were soluble starch (Synth), cassava pulp, which is consisted of a solid waste from starch extraction process, and corn bran obtained from germen extraction. 125 mL Erlenmeyers flasks with 25 ml of medium containing 1.0% of carbon source; 0.14% of $(NH_4)_2SO_4$;

unesp

.60% of K_2HPO_4; .20% of K_2HPO_4, 0.01% of $MgSO_4.7H_2O$, yeast extract 0.50%, peptone 0.20%, beef extract 0.20%, pH 5.0 were inoculated with 2.0 mL of previously developed cultures. The fermentation carried out in a rotary shaker at 100 rpm. At 24 h intervals the biomass was separated by centrifugation at 10000g for 20 min. and the supernatant was used as crude enzyme to evaluate amylases activities.

For SSF the carbon source used were bran and residues described above. The fermentation was carried out using 250 mL Erlenmeyer flask containing 5g of substrate and 10 mL of $(NH_4)_2SO_4$ 1.0%, $MgSO_4$ 0.10% solution (67% of moisture) at the same conditions as described above. At 24 h intervals fermented material was mixed with 40 mL distilled water, filtered at vacuum, and centrifuged. The experiments were performed in duplicate with three repetitions and results were presented as means.

Enzyme activity measurements: The α-amylase activity was analyzed by the starch-iodine method at 60°C (Medda and Chandra 1980). The reaction mixture containing 0.9 mL of 0.3% (w/v) soluble starch (Reagen) in 0.25 M acetate buffer pH 5.0, and 0.10 mL of crude enzyme solution was incubated at 60°C for 10 min. One unit of dextrinization activity (U) was defined as the amount of enzyme that hydrolysis 1 mg of starch in 10 min in the assay conditions.

Glucoamylase activity was assayed at 60°C in reaction mixture containing 0.50 mL of diluted crude enzyme solution and 0.5 mL of 0.50% starch in 0.25M acetate buffer pH 5.0. The glucose released was estimated by the glucose oxidase/peroxidase assay (Bergmeyer and Bernt 1974). One unity of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme that release 1 μmol of glucose released per minute.

Enzyme characterization

Optimum pH and temperature for enzyme activity: The enzyme activity was determined at 55°C, at different pH values using as buffers sodium acetate (pH 3.0-5.0), citrate-phosphate (pH 5.0-7.0), tris- HCl (pH 7.0-8.5) and glycine-NaOH (pH 8.5-11.0). The optimum temperature was assayed by incubation of the reaction mixture in temperatures at 40-90°C.

Thermostability: A thin film of mineral oil prevent evaporation of the enzyme solution which was incubated at different temperatures (10°C-95°C) for 2 h at pH 5.0. An aliquot was withdrawn and placed on ice before assaying for residual amylase activity at optimum pH and temperature.

pH stability: Crude enzyme was dispersed (1:1) in 0.10 M buffer solutions pH 3.0-5.0 (sodium acetate), pH 5.0-7.0 (citrate-phosphate), pH 7.0-8.5 (tris-HCl) and pH8.5-11.0 (glycine-Na-OH) and

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

maintained at 25°C for 24h. An aliquot was used to determine the remaining activity at the pH optimum and temperature.

Results

Selection of strains with amylolytic activity: 339 thermophilic microorganism strains (326 bacteria and 13 fungi) were isolated from 20 collecting which were able to grow on a medium containing starch as the only carbon source. These strains were tested for starch hydrolysis by plate assay. The strains considered as good producers of starch depolymerizing enzymes were those that presented clear halos around colonies of at least 0.5 cm (20), middling producers with halos between 0.2 to 0.4 cm (143) and poor producers were those which amylolytic activity was restrict to colonies (176).

Production of amylase from strains on liquid (SmF) and solid medium (SSF): The strains isolated that demonstrated amylolytic activity beyond of the of the colonies when assayed by plate method (162 bacteria and 01 fungus) were cultivated for amylase and glucoamylase production by SSF for 48h using wheat bran and by SmF for 24h using soluble starch as carbon source.

When cultivated on wheat bran the majority (89.6%) of strains produced α-amylase and glucoamylase activities and 8.6% produced only α-amylase. In SSF which was present in 55.5% of cultural media (Fig. 1).

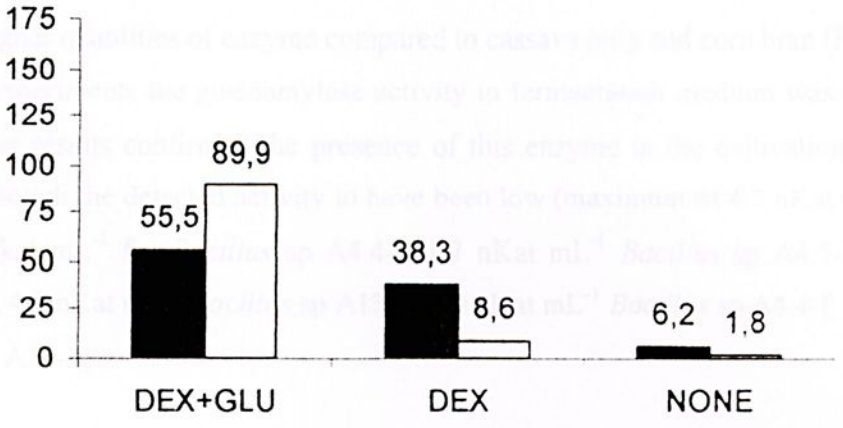


Figure 1- Production of α-amylase and glucoamylase by isolated microbial strains, in SmF and SSF fermentation process. The fermentations were carried out for 24 hours, at 55°C, by using soluble starch (FmS) and wheat bran (SSF) as carbon sources. Dex= dextrinization activity, Glu= glucoamylase activity, full bar= SmF, open bar= SSF

The studied strains showed considerable α-amylase production, reaching values as 200 nKat mL^{-1} in SmF, and 134 nKat mL^{-1} (or 1070 Ug^{-1} of substrate) on SSF. For glucoamylase it was obtained maximum values of 3.8 nKat mL^{-1} in SmF and 5.0 nkat (or 40 nKat g^{-1}) on SSF (data not shown).

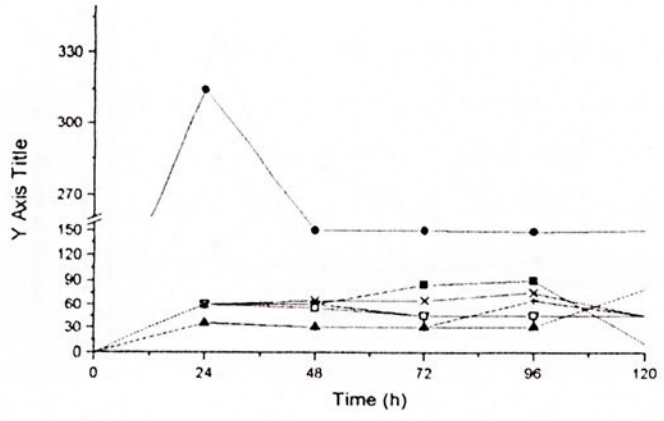
Among the strains studied 07 bacteria (*Bacillus* sp A4.1-b, *Bacillus* sp 4.4-i, *Bacillus* sp A4.5-2, *Bacillus* sp 4.7-1, *Bacillus* sp A13-8, *Bacillus* sp A4.4-f, and *Kurthia gibsoni* A11-4) presented the highest productions of α-amylase being selected for a next stage of experiments.

In these experiments the enzyme production was studied for 120 h in SmF by using different carbon sources (soluble starch, cassava pulp and corn bran at 1%) and by SSF using wheat bran, cassava pulp and corn bran as substrate.

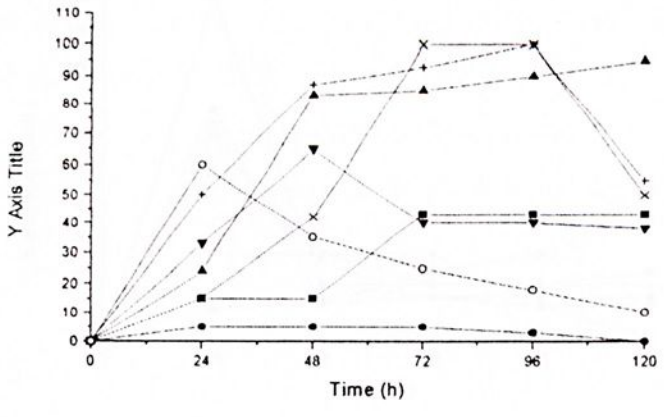
In figure 2, the results obtained in SmF were presented as means (three repetitions with duplicate) and indicated that the strain *Bacillus* sp A4.4-f showed the highest α-amylase production (192 nKat mL^{-1}) for all the media used, at 24 h of fermentation. No significant difference was observed between the quantities of enzyme obtained for this strain in function of the carbon source used. When the fermentation process was SSF, the medium composed by cassava pulp afforded a higher α-amylase by *Bacillus* sp A4.4-f which reached 317.3 nKat mL^{-1} or 2536 nKat g^{-1} of substrate (Fig.3). On the other hand, when wheat and corn bran were used as substrates, the *Bacillus* sp A4.4-f presented the

lower α-amylase production. In this medium, *K. gibsoni*, *Bacillus* A 4 $_{4i}$ and *Bacillus* sp A13-8 produced their higher quantities of enzyme compared to cassava pulp and corn bran (Fig. 3B).

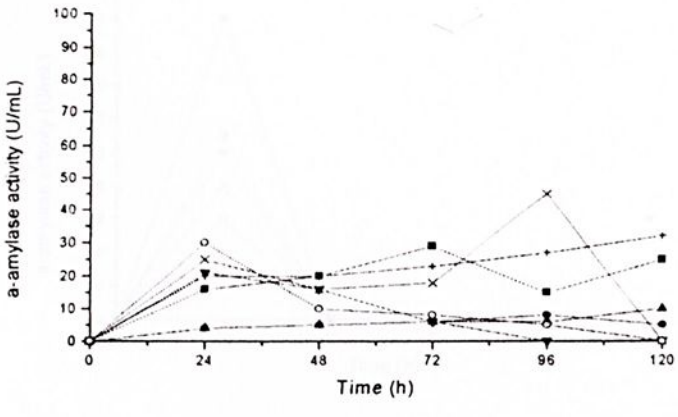
In these experiments the glucoamylase activity in fermentation medium was also studied (data not show) and the results confirmed the presence of this enzyme in the cultivation media of all the seven strains, although the detected activity to have been low (maximum of 4.2 nKat mL^{-1} for *Bacillus* sp A4.1-b, 3.0 nkat mL^{-1} for *Bacillus* sp A4.4-i, 1.7 nKat mL^{-1} *Bacillus* sp A4.5-2, 2.5 nKat mL^{-1} *Bacillus* sp 4.7-1, 4.2 nKat mL^{-1} *Bacillus* sp A13-8, 4.0 nKat mL^{-1} *Bacillus* sp A4.4-f, and 1.7 nKat mL^{-1} *Kurthia gibsoni* A11-4).



(A)

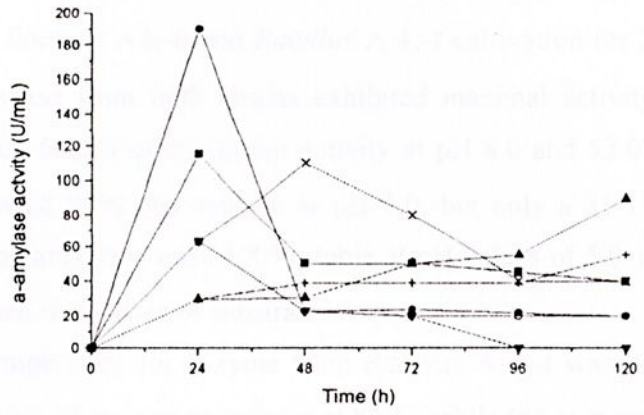


(B)

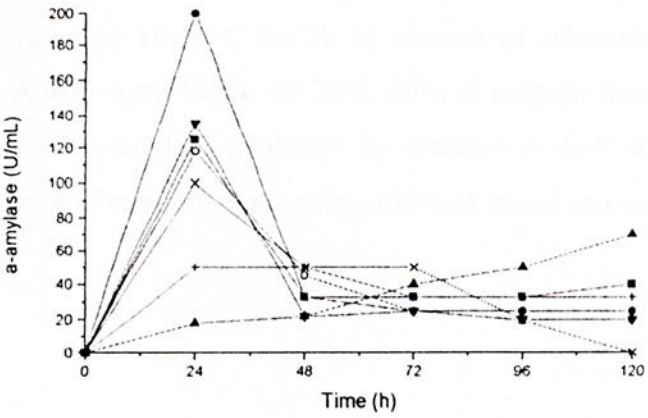


(C)

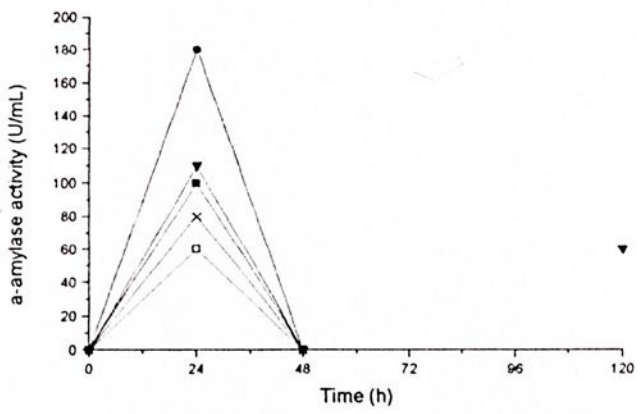
Figure 2- Effect of cultivation time in the α-amylase production by submerged fermentation. *Bacillus* sp $A4_1$-b (-■-), *Bacillus* sp $A4_4$-f (-●-),*Bacillus* sp A13-8 (-▲-),*Bacillus* sp A4-i (-▼-),*Bacillus* sp $A4_7$-1 (-◊-),*Kurthia gibsoni* a11-4 (-+-),*Bacillus* sp A5-2 (-x-). Carbon source: (A) soluble starch, (B) cassava pulp (C) corn bran.



(A)



(B)

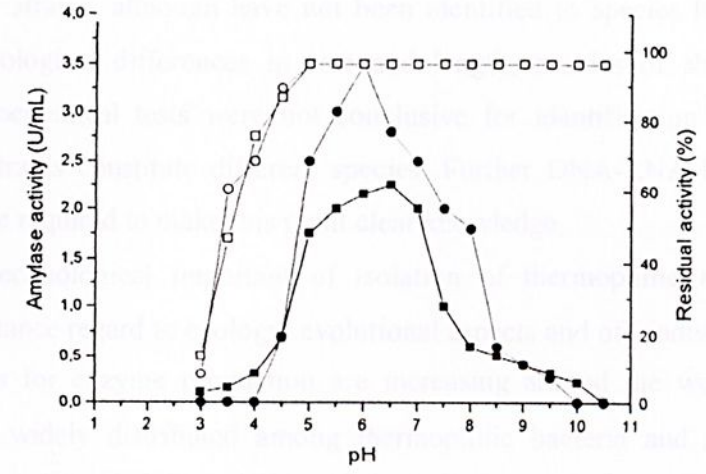


(C)

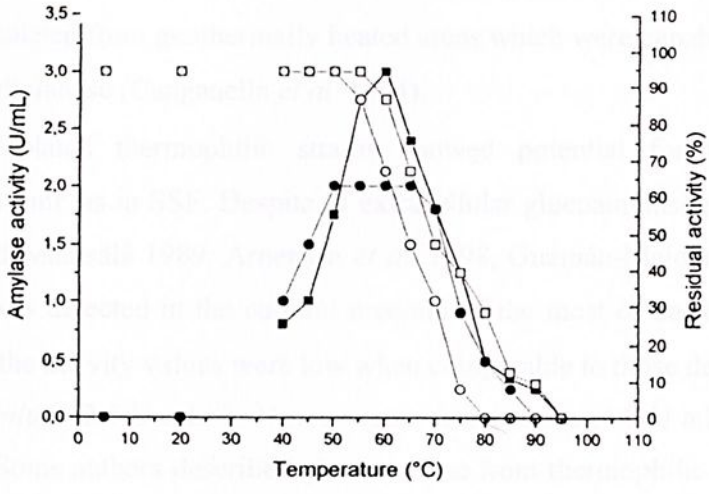
Figure 3- Effect of cultivation time in the α-amylase production by solid state fermentation. *Bacillus* sp $A4_1$-b (-■-), *Bacillus* sp $A4_4$-f (-●-),*Bacillus* sp A13-8 (-▲-),*Bacillus* sp A4-i (-▼-),*Bacillus* sp $A4_7$-1 (-◊-),*Kurthia gibsoni* a11-4 (-+-),*Bacillus* sp A5-2 (-x-). Carbon source: (A) soluble starch, (B) cassava pulp (C) corn bran.

Characterization of α-amylase: Characterization of the enzyme activities in the crude enzyme solution obtained from *Bacillus* $A4_1$-b and *Bacillus* A 4_4-f cultivation for 24 h on cassava pulp (FSS) was carried out. α-amylase from both strains exhibited maximal activity at pH 6.5. enzyme from *Bacillus* A 4_4-f presented 60.6% of maximum activity at pH 8.0 and 53.0% at pH 5.0 while amylase from strain A 4_1-b showed 80% this activity at pH 5.0, but only a 31.1% at pH 8.0 (Fig. 4A). As illustrated in Fig. 4A, the amylases were 100% stable at pH values of 5.0-10.5 and maintained 80% of its activity at pH 4.0 when in absence of substrate.

The optimum temperature for enzyme from *Bacillus* A 4_4-f was determined to be around 55-70°C, and it presented 50% of maximum activity at 80°C, while the enzyme produced by *Bacillus* $A4_1$-b presented maximum activity at 65°C, retaining 40% of this activity at 75°C (Fig. 4B). When maintained at temperature range 10-55°C for 2h in absence of substrate, the retained activities of amylases from *Bacillus* A 4_1-b were 100%. At 70°C, 50% of original these amylolytic activities was retained and at 80°C, 30%. α-amylase produced by *Bacillus* A 4_4-F was more sensitive to high temperature when in absence of substrate, presenting 100% of initial activity at 50°C, 50% at 65°C and 10% at 80°C (Fig. 4B).



(A)



(B)

Figure 4 – Effect of pH and temperature on activity and stability of α-amylase obtained by solid state fermentation of cassava pulp. Square= *Bacillus* sp $A4_1$-b; circle= *Bacillus* sp $A4_4$-f ; open symbol= stability in absence of substrate.

Discussion

The *Bacillus* strains, although have not been identified to species level, constitute rods with considerable morphological differences in size and length, besides of shape and position of the endospores. The biochemical tests were not conclusive for identification of the species, however indicated that the strains constitute different species. Further DNA-RNA hybridization studies and 16RNAr analyses are required to make this point clear knowledge.

Besides biotechnological important of isolation of thermophilic microorganisms we may consider their importance regard to ecology, evolutional aspects and of biodiversity. Programs to select new microorganisms for enzyme production are increasing around the world. Since the ability to hydrolyze starch is widely distributed among thermophilic bacteria and the industrial interest in thermostable amylases have led to isolation of these strains and characterization of their enzymes (Canganella and Trovatelli 1995, Castro *et al.* 1999, Ben Ali *et al.* 1999, Stamford *et al.*, 2001). The diversity of amylolitic enzymes has been reported for thermophilic species of *Bacillus, Clostridim* and *Flaviodobacterium* isolated from geothermally heated areas which were capable to produce α-amylase, α-glucosidase and pullulanase (Canganella *et al.* 1994).

The newly isolated thermophilic strains showed potential for thermostable α-amylase production as well in SmF as in SSF. Despite of extracellular glucoamylase production to be inherent to fungi (Vihinen and Mäntsälã 1989, Arnensen *et al.* 1998, Guzmán-Maldonado and Paredes-López, 1995), this enzyme was detected in the cultural medium of the most of bacteria in both fermentation processes. However, the activity values were low when comparable to those described for fungi such as *Scytalidium thermophilum* (3.6 U mL^{-1}), *Thermomyces lanuginosus* (1.0 U mL^{-1}) in similar conditions (Cereia *et al.* 2000). Some authors described glucoamylase from thermophilic bacterial species such as *Bacillus stearothermophilus* (Srivastava 1984), *Clostridium acetobutylicum* (Chojecki and Blaschek 1986), *C. thermohydrosulfuricum* (Hyun and Zeikus 1985), *C. thermosaccharolyticum* (Specka *et al.* 1991), *Clostridium* sp (Ohnishi *et al.* 1992). However, the comparison of enzyme levels produced by different organisms is not straightforward since distinct culture conditions have been used.

Cassava pulp, the solid waste produced after starch extraction and containing a significant proportion of starch granule and fiber (68% and 27% dry basis, respectively) (Sriroth *et al.* 2000), was a good substrate for amylase production by bacterial strains studied. These data corroborated those of Ilori *et al.* (1997) in study with *Micrococcus luteus*.

unesp

Although there are wide possibilities for improving enzyme production by optimizing fermentation conditions it was not within the scope of this study and additional experiments are required. On the other hand, these results suggest the use of waste from starch processing as substrate for obtainment of high added value bio-product may still contribute to the management of the environment.

Since any biotechnological process is likely to be based on the use of crude or partially purified enzymes, it is important to determine the optimal temperature and pH for activity and thermostability under these conditions. α-amylases produced by *Bacillus* strains $A4_1$-b and $A4_4$-f showed higher temperature optimum for activity and thermal stability comparable to that from *Bacillus subtillis* (Gerhartz, 1990), *Thermus* sp (Shaw *et al.* 1995), *Thermosipho* sp BI430 (Legin *et al.* 1997), *Nocardiopsis* sp (Stamford *et al.*2001), *Bacillus* sp WN11 (Mamo and Gessesse 1999). These properties are considerable to be very important for industrial starch liquefaction.

Optimum pH of two enzymes was 6.5, however, the activity detected at pH 5.0 was considerable (80.0% of the maximum for amylase from strain $A4_1$-b and 54.5% for enzyme produced by strain $A4_4$-f). Besides, these enzymes were stable over wide range pH values (4.0-10.5). Currently, thermostable α-amylase used in industrial starch processing are not stable at lower pH values where saccharification of liquefied starch is carried out. As a result, starch is liquefied around pH 7.0 and pH of liquefied slurry is adjusted down to 4.2-4.5 for moves the pH closer to pH optimum for saccharification (Mamo and Gessesse 1999). The use of liquefying amylases that are active and stable around the saccharification pH is economically attractive.

In conclusion, the detection of α-amylase and glucoamylase in the medium of strain cultivation at 55°C and the activities of their enzymes at 65-70°C suggest the potential of thermostable enzyme production by those microorganisms. In addition, a higher enzyme production might be expected from the cultivation of isolated strains under suitable conditions of enzyme inducer, at optimum pH and temperature. In other respects, characteristics of these enzymes regard to pH and temperature stability are attractive for industrial application.

Acknowledgements: The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

References

Arnesen, S., Ericksen, S.H., Olsen, J., Jensen, B.. Increased production of α-amylase from *Thermomyces lanuginosus* by addition ofTween 80. *Enzym. Microb. Technol.* 23,249-252 (1998).

Bergmeyer, H. U., Bernt, E. D-glucose determination with glucose oxidase and isomerase. In: *Methods of Enzymatic Analysis.* Vol.3 H.U. Bergmeyer, (Editor).pp. 1205-1212. Verlag-Chimie Academic Press, New York 1974.

Canganela, F., Trovatelli, L.D.. Ecological and physiological studies on thermophilic bacilli form sulfataric hot springs of central Italy. *J. Basic Microbiol.* 35, 9-19 (1995).

Castro, M., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Greece, L.J., Rosa, J.C., Polizeli, M.D.T.M.. Glucoamylase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* – biochemical and regulatory properties. *J. Basic. Microbiol* 40, 83-92(2000).

Chojecki, A., Blaschek, H.P.. Effect of carbohidrate source on alpha-amylase and glucoamylase formation by *Clostridium acetobutylicum* AS-1. *J. Ind. Microbiol.* 1,63-67(1986).

GERHATZ, W.. *Enzyme in industry.* VHC, Weinheim, pp78-79 1990.

Guzmám-Maldonado, H., Paredes- Lópes, O.. Amylolitic enzymes and products derived from starch: A review. *Crit.Rev. Food Sci. Nutr.* 35,374-403 (1995).

Janecek, S.. α- amylase family: Molecular Biology and Evolution. *Prog. Biophys. Biol.* 67,67-97 (1997).

Hamilton, L.M., Kelly C.T., Forgaty V.M.. Production and properties of the raw starch-digesting α-amylase of *Bacillus* sp IMD 435. Precess Biochem., 35,27-31 (1999).

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williamas, S.T.. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* In: william R. Hensyl, (Ed.), 9th ed, 787p, Baltimore 1994.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

Hyun, H.H., Zeikus, J.G.. General biochemical characterizations of thermostable pullulanase and glucoamylase from *C. Thermohydrosulfuricum. Appl. Environ. Microbiol.*, 49,1168-1173(1985).

Ilori, M.O., Amund, O.O., Omidiji, O.. Purification and properties of an α-amylase produced by a cassava- fermenting strain of *Micrococcus luteus. Folia microbiol.*, 42,445-449(1997).

Mamo, G., Gessesse, A.. Purification and characterization of two raw-starch-digesting thermostable α-amylase from a thermophilic *Bacillus. Enz. Microb. Technol.*, 25,433-438(1999).

Medda, G.L., Chandra, A.K.. New strains of *Bacillus lincheniformis* and *Bacillus coagulans* producing thermostable α-amylase active at alkaline pH. *J. Appl. Bacteriol.* 48,48-58 (1980).

Ohnishi, H., Kitamura, H. Minowa, T., Sakai, H., Ohta, T.. Molecular clonig of a glucoamylase gene from a thermophilic *Clostridium* and kinetics of the cloned enzyme. *Eur. J. Biochem.* 207,413-418(1992).

Rónaszeki, G., Nguyen, Q.D., Rezessy-Szabo, J.M. Hoschke, A., Bhat, M.K.. Screening of thermophilic strains of fungus *Thermomyces lanuginosus* for amylolytic activities. *Acta Aliment.* 29,71-79 (2000).

Shaw, J-F, Lin F-P., Chen, S-C, Chen H-C.. Purification and properties of an extracellular α-amylase from *Thermus* sp. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 36,195-200 (1995).

Secka, U., Mayer, F., Antranikian, G.. Purification and properties of thermoactive glucoamylase from *Clostridium thermosaccharolyticum Appl. Envirn. Microbiol.* 57,2317-2323 (1991).

Sriroth, K., Chollkup, R., Chotineeranat, S., Piyachomkwan, K., Oates, C.. Processing cassava waste for improved biomass utilization. *Biorresource Technol.* 71,63-69 (2000).

Srivastava, R.A.K.. Studies on extracellular and intracellular purified amylases from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus.* Enzyme Microb. Technol., 6,422-426(1984).

Stamford T.L.M., Stamford N.P., Coelho L.C.B.B., Araujo, J.M.. Productions and characterization of a thermostable α-amylase from *Norcadiopsis* sp endophyte of yam bean. *Biores. Technol.*, 76,137-141 (2001).

Vieille, C., Burdette, D.S., Zeikus, G.J.. Thermozymes. *Biotechnol. Annu. Rev.*,2,1-83 (1996).

Vieille, C., Zeikus, G.J..Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 65,1-43(2002).

Vihinen, M., Mäntsälä, P.. Microbial amylolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 24,329-418 (1989).

PRODUCTION OF THERMOSTABLE GLUCOAMYLASE BY NEWLY ISOLATED *Aspergillus flavus* A 1.1 AND *Thermomyces lanuginosus* A 13.37.

Eleni Gomes; Simone Regina de Souza; Roseli Picolo Grandi; Roberto Da Silva

ABSTRACT

13 thermophilic fungi strains were isolated from agricultural soil, tuberous rot and compost samples. Two strains were selected in function of their ability to produce considerable glucoamylase activity and were identified as *Aspergillus flavus* A1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A 13.37. The enzyme production was influenced by the starch types used as carbon source. Cassava starch shown to be the best substrate of glucoamylase production compared to starch for the both fungi. Enzymatic activities were determined using as substrates 0.3% soluble starch, 0.3% maltose and 0.3% of starch plus 0.1% maltose and data indicated that enzymes produced by *A. flavus* A1.1 hydrolyzed preferentially starch but also exhibited a significant maltase activity. The releasing higher glucose quantities when the substrate used was a mixture of starch and maltose suggested this fungus produced different enzymes. In case of enzymes from *T. lanuginosus* A 13.37 the study of the substrate specificity indicated that the enzyme was able to hydrolysis starch more efficiently than maltose and there was not increase in the glucose liberation when a mixture of starch and maltose was used as substrate, suggesting that only enzyme was secreted. Glucoamylases produced from *A. flavus* A1.1 and *T. lanuginous* A.13-37 have high optima temperatures (65°C and 70°C) with good thermostabilities in absence of substrate (maintained 50% of activity for 5 and 8 hours at 60°C, respectively) and stability in a wide pH range. These results offer an attractive alternative source of enzymes for industrial starch processing.

Key Words: Glucoamylase, α-glucosidase, *Aspergillus, Thermomyces*

Introduction

The hydrolysis of starch occurs by action of enzymes that can be divided in endoamylases, exoamylases and debranching amylases (26).

The endoamylases (EC 3.2.1.1) cleave α-1,4 glicosidic bonds in amylose, amylopectin and related polysaccaride but not the α-1,6 linkages. The products of hydrolysis are oligosaccarides of varying chain lengths and have α-configuration on the C_1 of the reducing glucose unit produced (2).

The exoamylases act preferentially on α-1,4 linkages from the nonreducing end successively, resulting on low molecular weight products. Currently two types of exoamylases are important in starch hydrolysis: glucoamylase (EC 3.2.1.3) of fungal origin attacks α-1,4 bonds releasing D-glucose molecules in the ß-configuration. This enzyme also attacks α-1,6 bond at branching points in the amylopectin molecule, but much more slowly than α1,4 linkages; α-glucosidase (EC 3.2.1.20) catalyze the splitting of α-D-glucosyl residues from the nonreducing end of substrates to release α-glucose (6,9); ß-amylase (EC 3.2.1.2) of plant or bacterial origin acts in an exo-fashion, from the nonreducing ends of the outer chains of starch or related polysaccharides and proceeds by gradual removal of maltose units in the ß-anomeric form (15).

Debranching enzymes including pullulanase (EC 3.2.1.41) that have specific action on α-1,6 linkages in pullulan, starch, amylopectin and related oligosaccharide and isoamylase that (EC 3.2.1.68) hydrolyzes α-1,6 linkages in amylopectin, but has a very low activity or no activity toward pullulan (11).

In industrial starch syrup production, the starch is liquefied at first stage at 105-107°C for 5-15 min, followed by a second stage for 60-180 min. at 95-98°C. Thermostable α-amylase are used for hydrolysis of starch in this liquefaction step. Upon completion of liquefaction, the slurry has to

be cooled to 55-60°C before the saccharification step, since glucoamylase from *Aspergillus niger* used in this stage is unstable at temperature above 60 °C (3).

High value is placed on the extreme thermostability and thermoactivity of amylases for use in the bioprocessing of starch. Thus, for industrial purposes, highly thermostable and environmentally compatible glucoamylases may be an important contribution to the starch processing industry.

On the other hand, the discovery, isolation, and application of different amylolytic enzymes resulted in the development of new hydrolyzed starch products and in a wide variety of syrup property differences, which can be exploited in many applications (26).

The objectives of this study were to evaluate glucoamylase production in different cultivation conditions from thermophilic fungi newly isolated and physico-chemical characterization of this enzyme.

MATERIAL AND METHODS

Isolation and identification of microorganisms: 2.0g of samples of agricultural soil, tuberous root, compost and animal manure were homogenized in sterile medium with pH 5.0 containing 1.0% soluble starch; 0.14% $(NH_4)_2SO_4$; 0.20% K_2HPO_4; 0.02% $MgSO_4$ $7H_2O$; 1.60 mg/L $MnSO_4.H_2O$; 1.40 mg/L $ZnSO_4.7H_2O$; 2.0 mg/L $CoCl_2$. The mixture was incubated at 45°C for 24h and after that, a loop of the homogenized culture was streaked onto surface of the same medium containing 3.0% agar and incubated at 45 °C for 24 to 72h. All morphologically contrasting colonies were purified by repeated streaking. Pure cultures were sub-cultures onto slants media for identification and enzyme studies. The fungi identification was based on morphological and biochemical characteristics (12). The stock cultures were maintained at 7°C on medium Potato Dextrose Agar (PDA).

Production of amylases on submerged fermentation (SmF): 125mL Erlenmeyers flasks with 25mL of medium containing 1.0 % carbon source; 0.14 % $(NH_4)_2SO_4$; 0.60 % K_2HPO_4; 0.20 % KH_2PO_4; 0.01 % $MgSO_4\ 7H_2O$, 0.50 % yeast extract, 0.20 % peptone, 0.20 % beef extract, pH 5.0 were inoculated with aliquots of micelial suspensions (approx. 5.0 mg/mL) of *Thermomyces* or spores suspension (10^6 spores/mL) of *Aspergillus*, which were obtained from a 7-day agar slant culture suspended in sterile 0.01% Tween 80 solution. The fermentation was carried out in a rotary shaker at 100 rpm with time and temperature in according to described. The biomass was separated by centrifugation at 10000g for 20 min. and the supernatant was used to evaluate amylase activities.

Effect of different carbon source, initial pH of the media and temperature of incubation on enzyme production: Corn or cassava starch at 1.0 % was used as carbon sources. pH of the media were adjusted to of 4.0, 5.0 or 6.0 and incubation temperatures were 40 or 45°C. The fermentation was carried out in the rotary shaker at 100 rpm, for 96h. The experiment was developed in a factorial design (2x3x2) with three repetitions. For statistical analysis (variance and Tukey text) was used software Estat (Free).

Enzymes activity measurements: Enzyme activity was assayed at 60°C in a reaction mixture containing 0.5 mL of diluted crude enzyme solution and 0.5 mL of substrate solution in 0.25M sodium acetate buffer pH 5.0. Were used as substrates 0.3% soluble starch, 0.3 % maltose or mixture of 0.3% soluble starch plus 0.1 % maltose (20). The amount of glucose released was estimated by the peroxidade/glucose oxidase assay (2). One unit of enzymatic activity (U) was defined as amount of enzyme that releases one μmol of glucose per minute.

Enzyme characterization: *Optimun pH and temperature for enzyme activity:* The enzyme activity was determined at 60 °C, at different pH values using as buffers sodium acetate (pH 3.0-5.0), citrate-phosphate (pH 5.0-7.0), tris-HCl (pH 7.0-8.5) and glycine-NaOH (pH 8.5-11.0). The optimum temperature was assayed by incubation of the reaction mixture at 40-90 °C.

Thermostability: A thin of mineral oil prevented evaporation of the enzyme solution which was incubated at different temperatures (10 °C-90 °C) for 1h at pH 5.0. Another experiment was carried out to assay the enzyme stability at 60 °C. The enzyme solution was maintained at this temperature for a period of 9h. In both assays an aliquot was withdrawn and placed on ice before assaying for residual enzyme activity at optimum pH and temperature.

pH stability: Crude enzyme was dispersed (1:1) in 0.1M buffer solutions pH 3.0-5.0 (sodium acetate), pH 5.0-7.0 (citrate-phosphate), pH 7.0-8.5 (tris-HCl) and pH 8.5-11.0 (glycine-NaOH) and maintained at 25°C for 24h. An aliquot was used to determine the remaining activity at the optimum pH and temperature.

RESULTS AND DISCUSSION

Selection of strains with amylolytic activity: Among 13 thermophilic fungi isolated from 20 collecting (200 samples), two strains were selected in function of their ability to grow on a liquid medium containing starch as the only carbon source, at 45 °C and to produce considerable glucoamylase activity. These strains were identified as *Aspergillus flavus* A1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A13.37.

Effect of carbon source, initial of the media and temperature of incubation on the glucoamylase production in submerged fermentation: The starch types used as carbon source

influenced the glucoamylase production by *A. flavus* A1.1, which was higher (with statistical significance at 1% level) in media containing cassava starch compared to corn starch (Fig. 1a-f). Not statistical difference was observed on enzyme synthesis by *T. lanuginosus* A13-37 on both carbon sources, but can be observed that enzyme activity was higher in the medium containing cassava starch (Fig 2a-f). Since there are differences in the amylose and amylopectin composition and quantities of lipids of both starch (corn starch has approximately 28 % amylose, 72 % amylopectin and 6.0 % lipids while cassava starch has approximately 17 % amylose, 83 % amylopectin and 0.1 % lipids (4), the results suggest that the composition and differences in the molecular structure of the starch could be affected the enzyme induction. Cruz et al. (8) observed that the ability of *Rhizopus* sp to produce amylolytic enzymes that release reducing units was higher when carbon source was amylose as compared to amylopectin, and that corn amylose was better inducer of enzyme than its homologous from potatoes.

Analysis of Figure 1 indicated that enzymes synthesis from *A. flavus* A1.1 growth on cassava starch was significantly higher when initial pH of the culture medium was 6.0 (5% level by Tukey test). However the enzyme activity was higher when the initial of the culture medium was pH 4.0 as compared with pH 5.0 (Fig 1c to 1f). This data indicating that two forms of enzymes could be produced. Enzyme synthesis by *T. lanuginosus* A.13.37 was higher at pH 5.0 and 6.0, as compared with pH 4.0 for both substrates.

Considering that microorganisms growth was not affected significantly by pH of the media (data not shown) the effect of pH can be related with regulatory mechanisms of enzymatic synthesis. A similar effect of pH on production and secretion of glucoamylase by *A. niger* was described by Wallis et al (28). They demonstrated that GA production was higher at pH 4.0 than at pH 5.5. Since enzyme activity was dissociated of biomass production, the authors speculated that pH and the high level of gluconic acid produced at this higher pH are controlling some aspect of enzyme production.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

Characterization of the pH signal of transduction pathway on *A. nidulans* has been completed at the molecular genetic level, although the biochemical functions of the proteins involved have yet to be elucidated (17;24).

In relation to temperature of incubation, not significant differences were detected on the enzyme synthesis when fermentation was carried out at 40 or 45 °C, according to statistical analysis, although higher activities were observed in some assays at 40 °C (Figs. 1 and 2).

In this experiment, the enzymatic activities were determined using as substrates 0.3 % soluble starch, 0.3 % maltose or 0.3 % of starch plus 0.1 % maltose. The results shown in Fig. 1 indicated that the enzymes produced by *A. flavus* A1.1 hydrolyzed preferentially starch (significantly 1 % level) and exhibited a low maltase activity. On the other hand crude enzyme released the highest glucose quantities when the substrate used was mixture of starch and maltose as compared with starch alone (Fig. 1e, 1f).

In case of enzymes from *T. lanuginosus* A 13.37 the data of Fig.2 indicate that the enzyme was able to hydrolyze starch more efficiently than maltose, but differently of enzyme from *A. flavus*, its activity on maltose was considerable. There was not increase in the glucose liberation when a mixture of starch and maltose was used as substrate.

Although α- glucosidade and glucoamylase are essentially differentiated by the anomer type products, that is, α-glucosidase produce α-glucose and glucoamylase, β-glucose (6), according Saha and Zeikus (20) the α-glucosidase activity can be determined in the presence of glucoamylase by comparing the results of enzyme incubation with starch or with starch plus maltose. The higher yield of glucose from the second substrate gives evidence of the presence of α-glucosidase. In this way, the results indicated that both glucoamylase and α-glucosidase could be secreted in the cultivation media of *A. flavus*. The presence of both enzymes was reported in cultivation media of *A. awamori*,

A. niger and *A. oryzae* (24) and was determined that α-glucosidase these fungi hydrolyses malto and malto-oligosaccharides but hydrolyses starch soluble very slowly, while glucoamylase is a starch-hydrolase capable of also degrading starch (21, 6).

On the other hand Tosi et al (25) have been reported that a purified glucoamylase from *H. grisea* showed considerable maltase activity, however with different pH optimum, effect of temperature and also activation energy for activity on starch and on maltose. Similar characteristics were described for glucoamylase from *Scytalidium thermophilum* (5). This glucoamylase characteristic have been attributed to the existence of a common catalytic site for starch and maltose hydrolysis but specialized subsites for each of these substrates. The presence of various subsites in was also determined for α-glucosidase from *Mucor javanicus* and *A. niger*. *M. javanicus* α-glucosidase has high activity on maltooligosaccharide and on soluble starch. This enzyme hydrolyses maltose and soluble starch at a single active site and has six subsites, which are more extend than other subsites described. This extended subsite structure could bind maltoligosaccharide on the bond-cleavage site, however, the smallest substrate, maltose, would be bound in a non-productive from and hydrolyses slowly as compared with larger maltooligosaccharide (22). In α-glucosidase from *A. niger* three subsites has been determined which hydrolyses preferentially maltooligosaccharide and maltose and hydrolyses soluble starch slightly (14).This difference in substrate specificity is due to subsite structure (21)

Our results support that *A. flavus* produce two different enzymes while *T. lanuginosus* seems produce one enzyme with preference to soluble starch, but not is possible to infer if it is a glucoamylase or α-glucosidase. Further investigations are required.

Enzyme characterization: Characterization of the glucoamylase activities in the crude filtrates obtained from *Aspergillus flavus* and *Thermomyces lanuginosus* cultivation was carried out. The enzyme from *A. flavus* exhibited maximum activity at pH 4.0. Approximately 86 % of this activity was observed at pH 3.5 and 57 % at pH 7.0, indicating a enzyme with activity in a wide pH range (Fig. 3a). The enzyme presented optimum activity at 65°C and 40 % of this activity at 70°C.

Enzyme from *T. lanuginosus* showed maximum activity at pH 4.5 and presented 67 % of this activity at pH 4.0 and at 5.5 (Fig. 3a). Optimum temperature for its activity was determined to be 70°C and the enzyme showed 67 % of maximum activity at 75°C (Fig. 3b).

As illustrated in Fig 3a, enzyme from *Aspergillus* was stable in the wide pH range, with 100% of stability at values of 5.0-9.0 and maintained 80% of this activity at pH 3.0 and 90% at pH 10.0. Glucoamylase from *Thermomyces* was more stable at pH 7.0-8.0, maintained 55 % of its activity at pH 3.0 and 75% at pH 10.0.

Enzyme produced by *Aspergillus* lost only 20% of the initial activity after 1h at 60°C with total inactivation at 80°C, while glucoamylase from *Thermomyces* showed activation of 30 % in relation to original activity after to be maintained at 50°C for 1h. After 1h at 60°C, the activity of enzyme was 20% higher than initial activity.

The thermostability of enzymes at 60°C was high. The retained activities of enzyme from *Aspergillus* were 85% after 1h and 45% after 7h at this temperature. The glucoamylase produced by *Thermomyces* increase its activity (20 %) when maintained for 1h at 60°C. After 8h at 60°C, 55% of the initial activity was observed (Fig. 3c).

The optimum pH found for *Aspergillus* glucoamylase is comparable to those from other *Aspergillus* species which have optimum active at pH value between 4.0-5.5 such as enzymes from *A. terreus* and *A. tamari* (pH 4.0) and *A. niger* (pH 5.0) (10; 1; 16). However, for *Thermomyces*

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

species have been described glucoamylases which neutral pH optimum such as glucoamylases from *H. grisea* (pH6.0) and *H. lanuginosus* (pH 6.6) (24 ;5).

In comparison, the enzymes differed in terms of their thermal stabilities and optimum temperatures (65 and 70°C) regarding of several fungal mesophilic species whose optimum temperature are between 40 and 50°C, i.e. glucoamylase from *Aspergillus* and *Rhizopus* strains which is described as susceptible to denaturation in temperatures above 60°C (13; 23). The enzymes were similar to glucoamylases from thermophilic fungi such as *Talaromyces duponte, Thermomyces lanuginosus* and *H. grisea* that present temperatures optima at 75°C, 70°C and 60°C, respectively (18; 19).

Since any industrial process is based on the use of crude or partially purified enzymes, it is important to determinate the optimum temperature for activity and thermostability under these conditions. Although α-amylase used in the commercial production of sugar syrups from starch are sufficiently stable at the high operating temperatures of reactor, the enzymes employed for saccharitification and for debranching of amylopectin are more thermolabile. Thus, glucoamylases with grater thermostability and higher activity temperatures are required.

Besides, thermostability, the stability and activity in a wide pH range are important properties of the enzymes from strains studied in this work. For saccharification, the pH of the liquefied slurry is adjusted down to 4.2-4.5 for moves the pH closer to pH optimum for *Aspergillus niger* GA. Use of enzymes with these characteristic in relation to pH eliminates the adjust pH step.

In conclusion, glucoamylases produced from *A. flavus* A1.1 and *T. lanuginosus* A.13-37 have high optima temperatures (65°C and 70°C) with good thermostability in absence of substrate (maintained 50% of activity for 5 and 8 hours at 60°C, respectively) and stabilities in a wide pH

range. These results offer an attractive alternative source of enzymes for industrial supply in starch processing.

Acknowledgements: The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

RESUMO

Entre 13 linhagens de fungos filamentosos isolados a partir de amostras de solo agrícola, tubérculos e de material em compostagem, duas foram selecionadas em função da capacidade de crescer em meio líquido contendo amido como única fonte de carbono, a 45°C, e produzir consideráveis quantidades de glucoamilase. Essas linhagens foram identificadas como *Aspergillus flavus* A1.1 e *Thermomyces lanuginosus* A13.37. O tipo de amido usado como fonte de carbono para o cultivo dos fungos, influenciou significativamente a produção de glucoamilase por *A. flavus*, sendo obtida uma maior quantidade da enzima em meio contendo amido de mandioca do que em meio com amido de milho. A produção da enzima por *T. lanuginosus*, também foi maior em meio contendo amido de mandioca, porém, a diferença não foi estatisticamente significativa. As atividades enzimáticas sobre amido (0,3%), maltose (0,3%) ou sobre mistura de 0,3% de amido com 0,1% de maltose, indicaram que as enzimas de *Aspergillus* hidrolisaram, preferencialmente, o amido, embora tenham mostrado atividade considerável sobre a maltose. A maior liberação de glicose a partir da mistura de substratos sugeriu que o fungo em questão possa secretar dois tipos diferentes de enzymas. Enzimas produzidas por *T. lanuginosus* hidrolisaram o amido e a maltose e não liberaram maiores teores de glicose quando o substrato constou de mistura de amido e maltose. As enzimas de *Aspergillus* e *Thermomyces* apresentaram elevadas temperaturas ótimas de atividade (65 e 70°C, respectivamente) com boa termoestabilidade em ausência de substrato (manutenção de 50% da atividade por 5 e 8 h respectivamente), além de estabilidade em ampla faixa de pH. Os resultados apresentados indicam uma importante fonte alternativa de glucoamilase para uso no processamento industrial de amido.

Palavras –Chave: Glicoamilase, α-glicosidase, *Aspergillus, Thermomyces.*

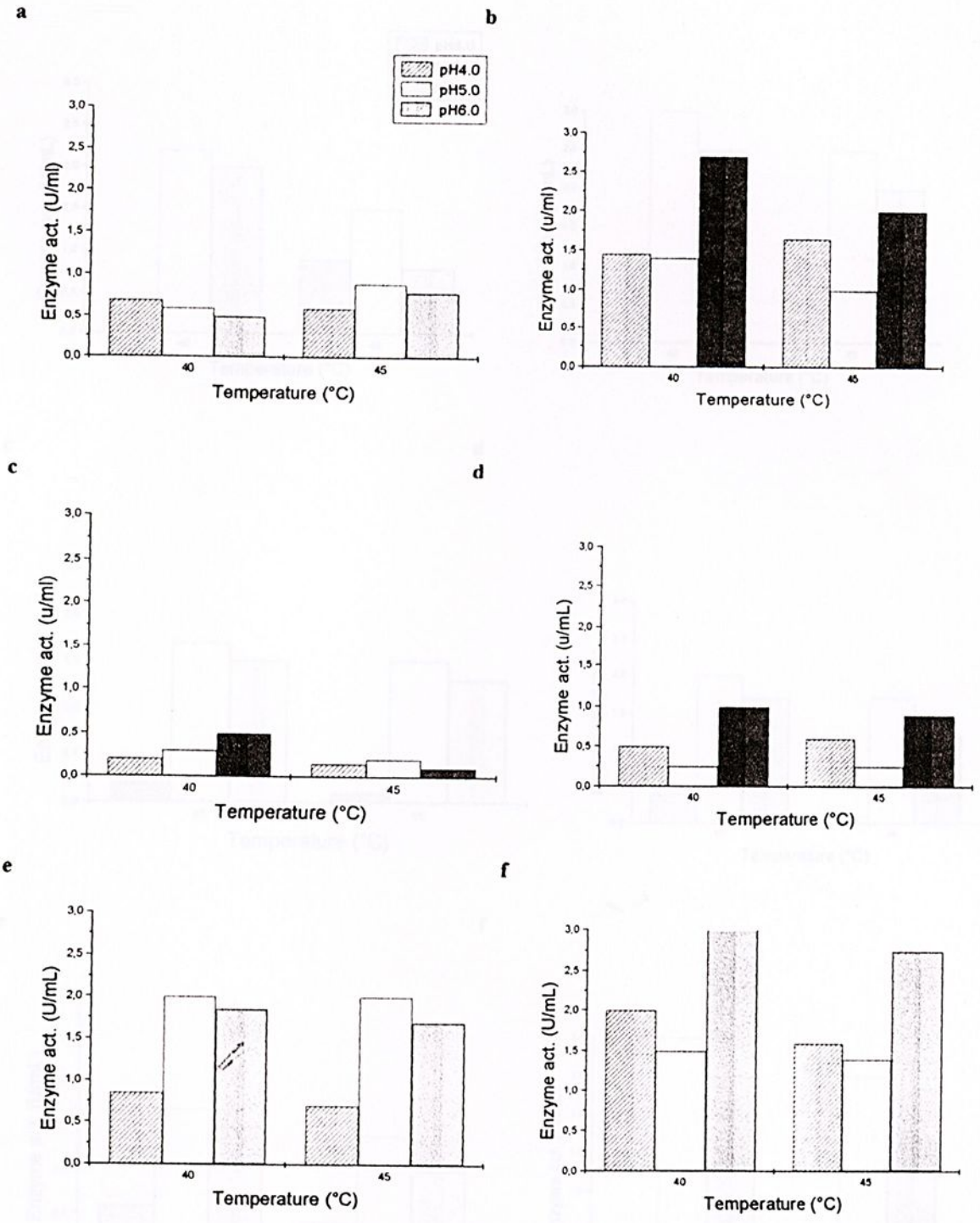


Figure 1: Effect of pH, temperature and carbon source on the glucoamylase production by *Aspergillus flavus* A1.1 determined with 0.3% starch (a, b), 0.3% maltose (c, d) and 0.3% starch plus 0.1% maltose (e, f). Culture media were supplemented with 1% corn starch (a, c, e) or 1% cassava starch (b, d, f)

a b

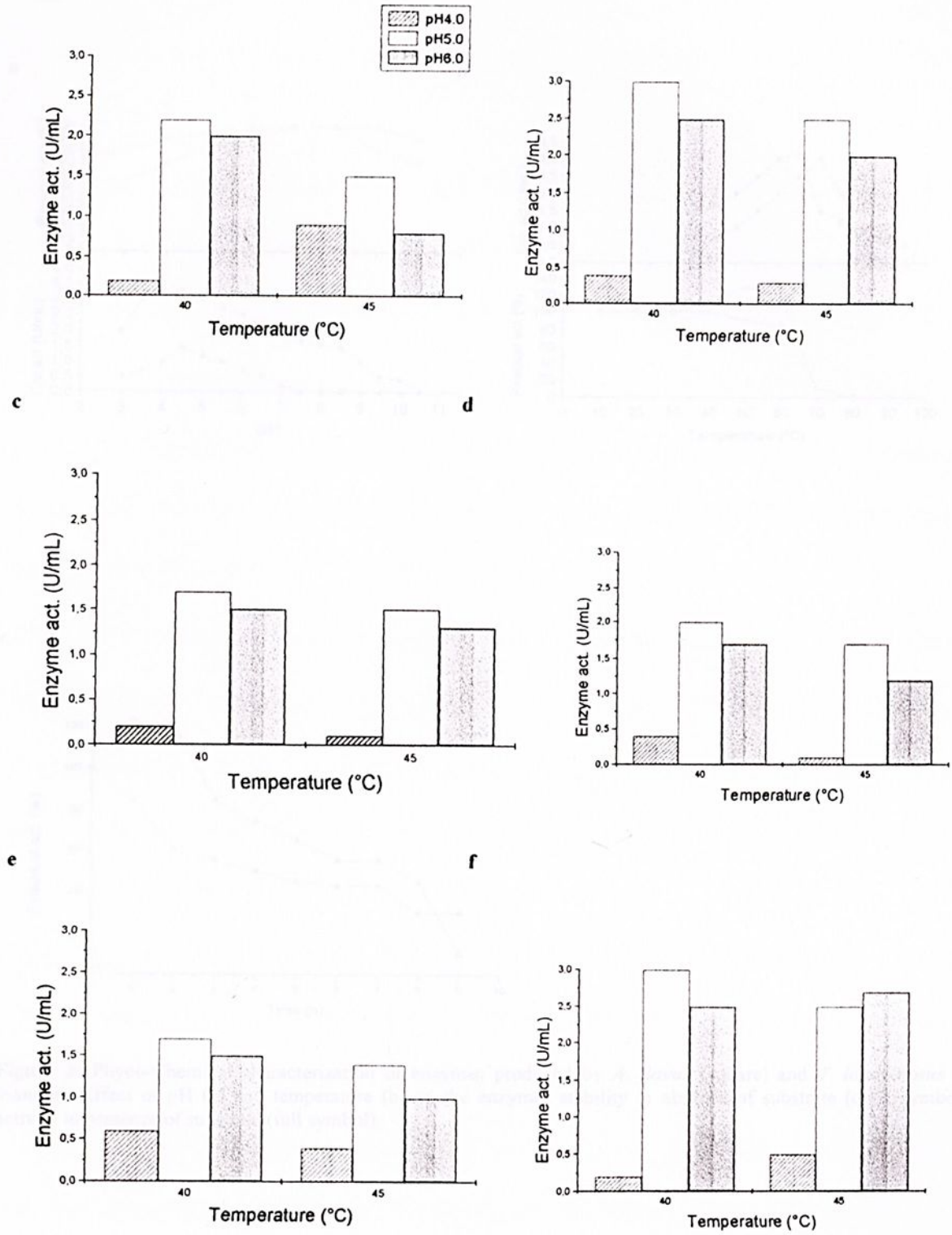


Figure 2: Effect of pH, temperature and carbon source on the glucoamylase production by *Thermomyces lanuginosus 14.37* determined with 0.3% starch (a, b), 0.3% maltose (c, d) and 0.3% starch plus 0.1% maltose (e, f). Culture media were supplemented with 1% corn starch (a, c, e) or 1% cassava starch (b, d, f)

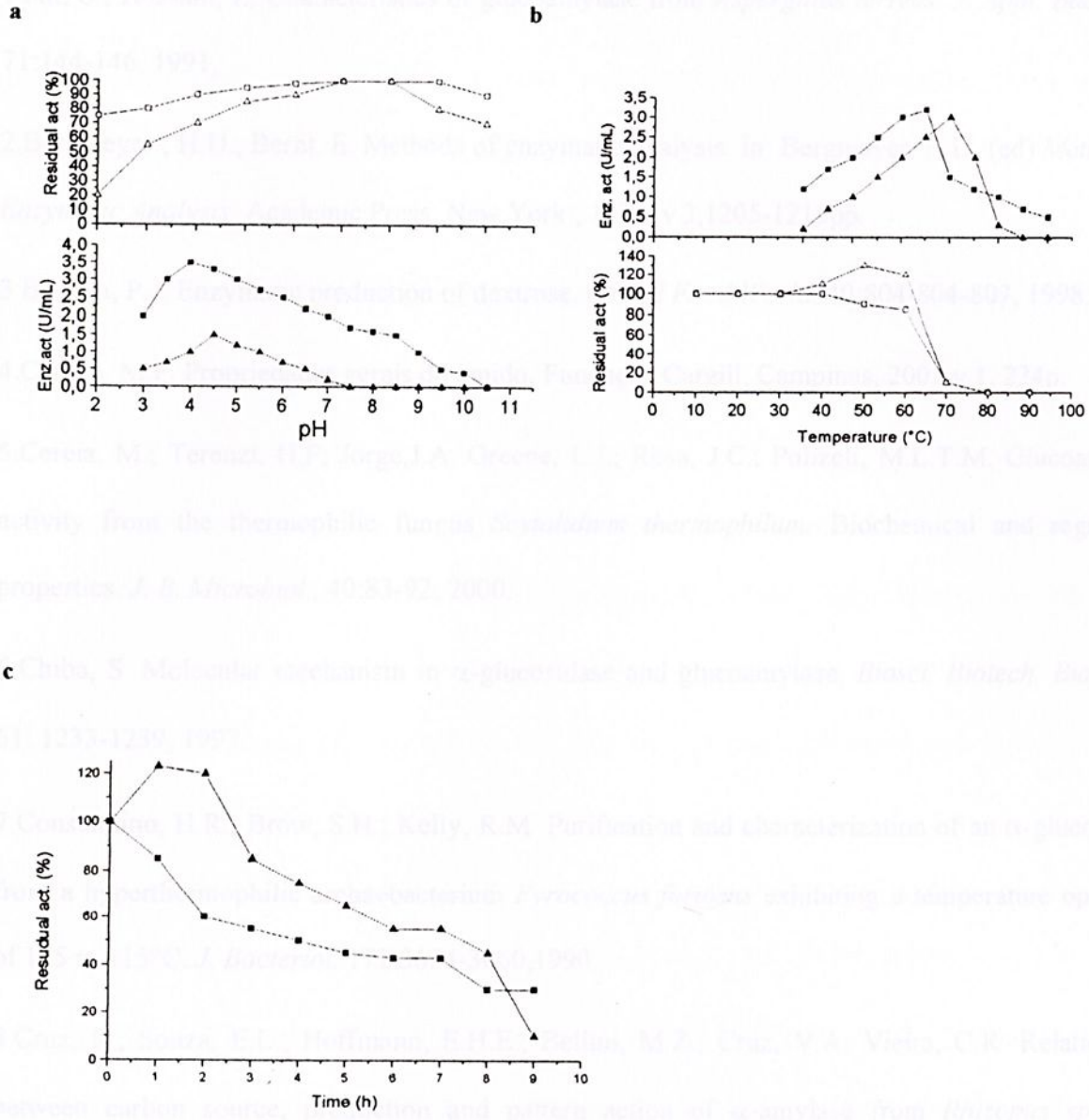


Figure 3: Phyco-Chemical characterization of enzymes produced by *A. flavus* (square) and *T. lanuginosus* (up to triangle): Effect of pH (a) and temperature (b) on the enzymes stability in absence of substrate (open symbol) and activity in presence of substrate (full symbol).

REFERENCES

1.Ali, S.; Hossain, Z. Characteristics of glucoamylase from *Aspergillus terreus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 71:144-146, 1991.

2.Bergmeyer , H.U., Bernt, E. Methods of enzymatic analysis. In: Bergmeyer, H.U. (ed) *Methods of Enzymatic Analysis.* Academic Press, New York:, 1974, v.3,1205-1215pp.

3.Brumm, P.J. Enzymatic production of dextrose. *Cereal Food World*, 40:804-804-807, 1998.

4.Cereda, M.P. Propriedades gerais do amido, Fundação Cargill, Campinas, 2001,v.1, 224p.

5.Cereia, M.; Terenzi, H.F; Jorge,J.A. Greene, L.J.; Rosa, J.C.; Polizeli, M.L.T.M. Glucoamylase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum.* Biochemical and regulatory properties. *J. B. Microbiol.*, 40:83-92, 2000.

6.Chiba, S. Molecular mechanism in α-glucosidase and glucoamylase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61: 1233-1239, 1997.

7.Constantino, H.R.; Brow, S.H.; Kelly, R.M. Purification and characterization of an α-glucosidase from a hyperthermophilic archaebacterium *Pyrococcus furiosus* exhibiting a temperature optimum of 105 to 115°C. *J. Bacteriol.* 172:3654-3660,1990.

8.Cruz, R.; Souza, E.L.; Hoffmann, E.H.E.; Bellini, M.Z.; Cruz, V.A; Vieira, C.R. Relationship between carbon source, production and pattern action of α-amylase from *Rhizopus sp. Rev. Microbiol.*, 28:101-105, 1997.

9. Frandsen, T.P.; Svensson, B. Plant α-glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. *Plant Mol. Biol.*, 37:1-13, 1998.

cm 1 2 3 4 5 6 7 8 unesp 12 13 14 15 16 17 18 19

10.Ghosh, A.; Chatterjee, B.; Das, A. Purification and characterization glucoamylase from *Aspergillus terreus* NA-170 mutant. *J. Apll. Bacteriol.*, 71:162-169, 1991.

11.Guzman-Maldonato, H.; Paredes-Lópes O. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. *Crit Rev. Food Sc. Nut.*, 35:373-403, 1995.

12.Hawksworth, D.L.; Sutton, B.C.; Ainsworth; G.C. Ainsworth; Bisby's *Dictionary of the Fungi*. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 1983.

13.James, J.A., Lee, B.H. Glucoamylases: Microbial sources, industrial application and molecular biology-A review. *J. Food Biochem.*, 21:1-52, 1997.

14.Ktia, A.; Matsui, H.; Somoto, A.; Kimura, A.; Takata, M.; Chiba, S. Substrate specificity and subsite afinities of cristaline α-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* 55: 3237-2335, 1991.

15. Manjunath, P.; Shenoy, B.C.; Raghavendra Rao, M.R., Fungal glucoamylases- Review. *J.Appl. Biochem.*, 5:235-260, 1983.

16.Moreira, F.G.; Lima, F.A.; Pedrinho, S.R.F.; Lenatorviez, V.; Souza, C.G.M.; Peralta, R.M. Production of amylases by *Aspergillus tamari*. *Rev. Microbiol.*, 30:157-162, 1999.

17.Negret Urtasun S., Reiter W., Diez E., Denison S.H., Tilbur J., Espeso E.A., Penalva M.A., Arst H.N. Ambient pH signal transduction in *Aspergillus:* completion of gene characterization. *Mol. Microbial.* 33:994-1003, 1999.

18.Nguyen Q, Rezessy-Szabó, J.M., Claeyssens M. Stals I, Hoschke Á. Purification and characterization of amylolytic enzymes from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* strain ATCC 34626. *Enz. Microbial Technol.*, 31:345-352, 2002.

19.Rónaszéki, G., Nguyen Q, Rezessy-Szabó, J.M.; Hoschke Á.; Bhat, M.K. Screening the strains of thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* for amylolytic activities. *Acta Aliment.*, 29:71-79, 2000.

20.Saha, B.C; Zeikus, J.G. Microbial glucoamylases: biochemical and biotechnological features. *Starch/Stärk*, 41:57-64, 1989.

21.Sugimoto, M.;Ohta, T.; Kawai, F. Change in maltose and soluble activities of chimeric α-glucosidase of *Mucor javanicus* and *Aspergillus oryzae. Biochem. Bioph. Acta*, 1645:1-5, 2003.

22.Sugimoto, M.; Suzuki, Y. Hydrolytic action on the mixture of maltose and soluble starch by α-glucosidase from *Mucor javanicus* IFO 4570. *Biosci. Biotech. Bichem.*, 58:1535-1536, 1994.

23.Swift, R.H.; Wiebe M.G., Robson G.D., Trinci A.P.J Recombinant glucoamylase production by *Aspergillus niger* B1 in chemostat and pH auxostat cultures. *Fungal Gen. Biol., 25:100-109, 1998.*

24.Taylor, P.M.; Naiper, E.J., Fleming, I.D. Some properties of a glucoamylse produced by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosa. Carbon. Res.*, 61:301-308, 1978.

25.Tosi, L.R.O.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A. Purification and characterization of an extracellular glucoamylase from the thermophilic fungus *Thermomyces grisea* var. *termoidea. Can. J. Microbiol.*, 39:846-852, 1993.

26.Vielle, C.; Zeikus, G.J. Hyperthermophilic Enzymes source, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol.*, Rev. 65:1-43, 2001.

27.Vihinen, M.; Mäntsälä, P. Microbial amylolytic enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 24:329-418, 1989.

28.Wallis, G.L.F.; Swift, R.J.; Atterbury, R.;Trappe, S.; Rinas, U.; Hemming, F.W.; Wieb, M.G.; Trinci, A.P.J.; Peberdy, J.F.. The effect of pH on glucoamylase production, glicosylation and chemostat evolution of *Aspergillus niger. Bioch. Bioph. Acta,* 32:-112-122, 2001.