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

**Purificação e caracterização bioquímica de
poligalacturonases produzidas pelo fungo *Penicillium
viridicatum* RFC3 em fermentação em estado sólido e
submersa**

DENIS SILVA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de concentração em Microbiologia Aplicada).

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

**Purificação e caracterização bioquímica de
poligalacturonases produzidas pelo fungo *Penicillium
viridicatum* RFC3 em fermentação em estado sólido e
submersa**

DÊNIS SILVA

ORIENTADOR: PROF^A. DR^A. ELENI GOMES

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de concentração em Microbiologia Aplicada).

576 Silva, Dênis
S586p Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases produzidas pelo fungo *Penicillium viridicatum* RFC3 em fermentação em estado sólido e submersa / Denis Silva. – Rio Claro : [s.n.], 2006
158 f. : il., gráfs., tabs.

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

1. Microorganismos. 2. Aproveitamento de resíduos agrícolas. 3. Enzimologia. 4. Processo fermentativo. I. Título.

ESTE TRABALHO É DEDICADO:

Aos meus pais, Antonio e Sonia, e a minha irmã Daniele, pelo grande incentivo, apoio, carinho, amor e ensinamentos que só uma família de verdade pode ser...

*Aos meus avós Dolores, Ezequiel, Maria e José... que se fizeram presentes em minha vida e estão vivos dentro de mim... obrigado!
A Sabrina, meu amor, que sempre me incentivou e compreendeu nos momentos difíceis deste trabalho... o que dizer... apenas te amo!!!!*

Essas pessoas tão especiais foram e ainda são alicerces nos momentos de alegria e dificuldade foram, graças a Deus, coladas em minha vida e são hoje a causa e a consequência deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dr^a. Eleni Gomes, mais que orientadora, uma amiga, durante estes nove anos de convivência e pelo resto de nossas vidas... sempre serei grato por acreditar no meu trabalho e por saber me corrigir sempre que necessário, meu muito obrigado

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva pelo apoio e disposição em sempre ajudar a esclarecer as dúvidas cotidianas.

A minha família, alicerce em minha vida...

Aos meus avós que nem sempre entenderam esse trabalho mas que sempre deram seu carinho, na forma de um simples "bacana pra chuchu!"

A Sabrina pelo carinho e incentivo de todas as horas...

Ao Eduardo e Rodrigo, meus bons amigos, agradeço por todos esses anos de convivência e trabalho juntos, pelas conversas, projetos de vida... a vocês desejo todo sucesso em suas vidas!

Ao pessoal do Laboratório, Alexandre, Aline, Ana Flavia, Ana Paula, Andréia, Caio, Carol, Claudinei, Dani, Ellen, Érika, Fabiana, Gisele, Heloiza, Hamílton, Marcelo, Natalia, Patrícia, Paula, Solange, Tony, Viviane (bibian) e ao pessoal de Rio Claro Guilherme (mineiro), Fabrício (peão), Márcia, Leo,... pessoas tão

diferentes e singulares entre si, meu muito obrigado por serem minha família, pelo auxílio nas dúvidas de bancada e pelas proveitosas discussões no nosso dia-a-dia.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, doando seu tempo e seus conhecimentos, minhas sinceras saudações.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) por acreditar neste trabalho e viabiliza-lo através da concessão da bolsa de auxílio à pesquisa e da reserva técnica.

A Deus... o princípio e o fim de tudo!

ESTRUTURA DA TESE

Esta tese está organizada na forma de capítulos os quais estão em formato para publicação em revistas especializadas, sendo que alguns já foram submetidos e outro já está publicado.

Um resumo do trabalho com seu abstract foi incluído para orientar o leitor na relevância científica do trabalho.

Na primeira e segunda parte (itens I e II) são apresentados uma introdução geral e uma revisão de literatura envolvendo a importância dos sistemas fermentativos sólidos e submersos para a biotecnologia, assim como a estrutura da pectina e a produção e purificação de pectinases provenientes destes dois sistemas. Finalmente esse capítulo encerra-se com um panorama da aplicação de pectinases na indústria.

No terceiro e quarto item (capítulos I e II) estão apresentados os estudos referentes a produção de poligalacturonases em fermentação em estado sólido (FES) além da purificação e caracterização da enzima. O primeiro capítulo foi redigido em inglês e publicado pela Process Biochemistry em 2005. O segundo capítulo mostra a purificação da poligalacturonase através da fermentação em

estado sólido e sua caracterização bioquímica. Este capítulo foi redigido em inglês na forma de um artigo e submetido a *Process Biochemistry*, segundo suas normas.

No quinto e sexto item (capítulos III e IV) estão apresentados os estudos referentes a produção de poligalacturonases em fermentação submersa (FSM) além da purificação e caracterização da enzima. O terceiro capítulo aborda a produção da enzima e foi redigido na forma de um artigo. O capítulo IV que mostra a purificação e caracterização da PG foi redigido em inglês na forma de um artigo e submetido a o *Journal Biotechnology*, segundo suas normas.

Finalmente, no sétimo item serão apresentadas as considerações finais seguidas da conclusão geral do trabalho (oitavo item) e no nono item uma lista de referências bibliográficas citadas na tese.

ÍNDICE

	<i>página</i>
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUÇÃO	5
II. REVISÃO DA LITERATURA	8
1. Fermentação em estado sólido (FES) e submersa (FSM)	8
1.1. Vantagens e desvantagens da FES e FSM.....	15
1.2. Substratos utilizados em FES e FSM	17
2. Enzimas pectinolíticas	22
2.1. Classificação das pectinases	25
2.2. Produção de pectinases.....	28
2.3. Purificação de pectinases	32
2.4. Aplicação de pectinases	36
III. CAPITULO I. Production of pectinase by solid-state fermentation with <i>Penicillium viridicatum</i> RFC3	40
Abstract.....	40
Key Words	40
1. Introduction	41
2. Material and methods	42
2.1. Microorganism and inoculum	42

2.2. Medium for solid substrate fermentation (SSF) and enzyme production	42
2.3. Measurement of reducing and total sugar.....	42
2.4. Enzyme activity measurements	42
2.4.1. Exo-polygalacturonase (exo-PG), amylase, xylanase, CMCase	42
2.4.2. Endo-polygalacturonase (endo-PG)	43
2.4.3. Pectin lyase (PL)	43
2.4.4. Pectin methylesterase (PE)	43
2.5. Statistical analysis	44
3. Results	44
4. Discussion.....	45
5. References	47

IV. CAPITULO II. Production, purification, and characterization of a polygalacturonase produced by <i>Penicillium viridicatum</i> RFC3 in solid state fermentation of agroindustrial waste	51
Abstract.....	51
Key Words	51
1. Introduction	52
2. Materials and methods	52
2.1. Microorganism and inoculum:	52
2.2. Medium for solid substrate fermentation (SSF) and enzyme production:	53
2.3. Measurement of reducing and total sugar:.....	53
2.4. Enzyme activity measurements	53
2.5. Enzyme purification procedure	54
2.6. Analytical electrophoresis	54
2.7. Protein estimation.....	55
2.8. Enzyme characterization.....	55
3. Results and Discussion	56
3.1. Production of PG by SSF.....	56

3.2. Purification of PG	57
3.3. Biochemical properties of the purified polygalacturonase	58
4. Conclusions	60
5. References	61

V. CAPITULO III. Produção de poligalacturonase por *Penicillium viridicatum*

RFC3 em fermentação submersa.....71

Resumo	71
<i>Palavras chave</i>	72
1. Introdução.....	72
2. Materiais e Métodos	73
2.1. Microrganismo.....	73
2.2. Meios de cultivo	73
2.2.1. Meio de manutenção.....	73
2.2.2. Inóculo	73
2.3. Obtenção da enzima por fermentação submersa	73
2.4. Determinação do crescimento microbiano	74
2.5. Medida da atividade de poligalacturonase (PG)	74
2.6. Determinação de proteínas totais.....	74
2.7. Análise estatística dos dados.....	75
3. Resultados	76
3.1. Produção de Exo-PG em FSM.....	76
3.1.1. Resíduos agroindustriais e pectina como fontes de carbono	76
3.1.2. FSM em Água Amarela	79
3.1.3. Seleção da melhor fonte de carbono para produção da PG	82
4. Discussão	83
5. Conclusões	86
6. Referências Bibliográficas.....	87

VI. CAPITULO IV. Purification and characterization of a polygalacturonase from <i>Penicillium viridicatum</i> RFC3 produced in submerged fermentation using orange bagasse as carbon source.	101
Abstract.....	101
Key Words	101
1. Introduction	102
2. Material and Methods	103
2.1. Microorganism	103
2.2. Media, cultivation of microorganism and enzyme production	103
2.3. Enzyme activity measurements	103
2.4. Enzyme purification procedure	104
2.5. Analytical electrophoresis	104
2.6. Protein estimation.....	105
2.7. Enzyme characterization.....	105
3. Results and discussion.....	106
3.1. Production of PG	106
3.2. Purification of PG	107
3.3. Characterization of PG	108
4. Conclusions	110
5. References	111
VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS	121
VIII. CONCLUSÕES	123
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

LISTA DE FIGURAS

	<i>página</i>
I. INTRODUÇÃO	
II. REVISÃO DA LITERATURA	
Figura 1: Estrutura esquemática da parede celular vegetal	23
Figura 2: Estrutura da molécula de pectina parcialmente esterificada (SERRA <i>et al.</i> , 1992).....	24
Figura 3: Ação das pectinases sobre as substâncias pécticas (SERRA <i>et al.</i> , 1992). (PMGL – polimetilgalacturonase liase, PMGE, polimetilgalacturonase esterase, PMG – polimetilgalacturonase, PGL – poligalacturonase liase, PG – poligalacturonase).	28
III. CAPÍTULO I	
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.....	48
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%	49

Figure 3: Hydrolytic enzymes produced by <i>Penicillium viridicatum</i> RFC3 by solid-state fermentation of mixture of wheat bran and orange bagasse (1:1 w/w).CMCase (-X-), xylanase (-☞-), pectin esterases (-↯-) and amylase (-+).	50
---	----

IV. CAPITULO II

Figure 1: Production of Exo-PG by <i>Penicillium viridicatum</i> RFC3 in solid state fermentation with wheat bran and orange bagasse (1:1 – w/w).	66
Figure 2: Gel filtration chromatography of PG on Sephadex G-50 (2.5 x 80 cm) equilibrated with 40 mmol L ⁻¹ acetate buffer, pH 5.0. (A) crude extract concentrated with ultrafiltration 10 kDa cut-off, (B) crude extract treated with cauloin (40 mg mL ⁻¹).	66
Figure3: SDS-PAGE of purified PG from Gel filtration chromatography on Sephadex G-50	67
Figure 4: PG Characteristics: (A) Substrate specificity: 1. Polygalacturonic acid; 2. citrus pectin (26% esterified); 3. commercial citrus pectin (87% esterified); 4. citrus pectin (92% esterified). 5. apple pectin (high esterified); (B) Mode of action of PG (endo and exo activity).	67
Figure 5: Hydrolyse products of Exo-PG. 3G (trigalacturonic acid), 2G (digalacturonic acid), 1G (galacturonic acid), H (enzymatic hydrolysed).	68
Figure 6: (A) Effect of pH on activity of Exo-PMG; (B) Effect of pH on the stability of Exo-PG.	68
Figure 7: (A) Effect of Temperature on activity of Exo-PG; (B) Effect of temperature on the stability of Exo-PMG.	69
Figure 8: Half-life of Exo-PMG (60°C / 1 h).	69
Fig 9: Kinetics parameters of purified Exo-PMG in apple pectin (high esterified) (A), with Ba ⁺² (B).	70

V. CAPÍTULO III

- Figura 1: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio contendo extrato de farelo de trigo como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-|-), 5,0 (-?-) e 5,5 (-? -).
- A: Produção média de Exo-PG (U/mL)
 B: Açúcares redutores (mg/mL)
 C: Proteína dos meios (?g/mL)
 D: Biomassa produzida (mg/mL)
 E: Variação do pH do meio ao longo da fermentação90
- Figura 2: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio contendo extrato do bagaço de laranja como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-|-), 5,0 (-?-) e 5,5 (-? -).
- A: Produção média de Exo-PG (U/mL)
 B: Açúcares redutores (mg/mL)
 C: Proteína dos meios (?g/mL)
 D: Biomassa produzida (mg/mL)
 E: Variação do pH dos meios ao longo da fermentação91
- Figura 3: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio contendo extrato de farelo de trigo e bagaço de laranja (1:1 – p/p) como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-|-), 5,0 (-?-) e 5,5 (-? -).
- A: Produção média de Exo-PG (U/mL)
 B: Açúcares redutores (mg/mL)
 C: Proteína dos meios (?g/mL)
 D: Biomassa produzida (mg/mL)
 E: Variação do pH do meio ao longo da fermentação92
- Figura 4: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio semi-sintético M1 contendo pectina como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-|-), 5,0 (-?-) e 5,5 (-? -).
- A: Produção média de Exo-PG (U/mL)
 B: Açúcares redutores (mg/mL)
 C: Proteína dos meios (?g/mL)
 D: Biomassa produzida (mg/mL)
 E: Variação do pH do meio ao longo da fermentação93
- Figura 5: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio contendo Água Amarela (s/ diluição) como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-|-), 5,0 (-?-) e 5,5 (-? -).
- A: Produção média de Exo-PG (U/mL)
 B: Açúcares redutores (mg/mL)
 C: Proteína dos meios (?g/mL)
 D: Biomassa produzida (mg/mL)
 E: Variação do pH do meio ao longo da fermentação95

- Figura 6: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio contendo Água Amarela (diluída 2x) como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-|-), 5,0 (-?-) e 5,5 (-? -).
- A: Produção média de Exo-PG (U/mL)
 B: Açúcares redutores (mg/mL)
 C: Proteína dos meios (?g/mL)
 D: Biomassa produzida (mg/mL)
 E: Variação do pH do meio ao longo da fermentação96
- Figura 7: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio contendo Água Amarela (diluída 4x) como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-|-), 5,0 (-?-) e 5,5 (-? -).
- A: Produção média de Exo-PG (U/mL)
 B: Açúcares redutores (mg/mL)
 C: Proteína dos meios (?g/mL)
 D: Biomassa produzida (mg/mL)
 E: Variação do pH do meio ao longo da fermentação97
- Figura 8: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio contendo Água Amarela (diluída 10x) como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-|-), 5,0 (-?-) e 5,5 (-? -).
- A: Produção média de Exo-PG (U/mL)
 B: Açúcares redutores (mg/mL)
 C: Proteína dos meios (?g/mL)
 D: Biomassa produzida (mg/mL)
 E: Variação do pH do meio ao longo da fermentação98

VI. CAPÍTULO IV

- Figure 1: Production of PG by *P. viridicatum* in submerged fermentation with orange bagasse 3% and citrus pectin. PG (-?-), Reducing sugars (-?-); pH (..?..) and biomass (-+-).116
- Figure 2: Gel filtration chromatography of PG on Sephadex G-75 (2.5x90cm) equilibrated with 40 mmol l⁻¹ acetate buffer, pH 4.0. (A) crude extract concentrated with ultrafiltration 10 kDa cut-off, (B) crude extract after ultrafiltration with 50 and 10 kDa cut-off.116
- Figure 3: Ion-exchange chromatography of PG on Q Sepharose (1x30cm) equilibrated with 40 mmol l⁻¹ acetate buffer, pH 4.0117

Figure 4: SDS-PAGE gel electrophoresis of purified PG from ion-exchange chromatography (Q Sepharose).....	117
Figure 5: PG Characteristics: (A) Substrate specificity: 1. Polygalacturonic acid; 2. citrus pectin (26% esterified); 3. citrus pectin (92% esterified); 4. apple pectin (high methoxylation); 5. commercial citrus pectin (87% esterified); (B) Mode of action of PG (endo and exo activity).	118
Figure 6: Hydrolyse products of PG. 3G (trigalacturonic acid), 2G (digalacturonic acid), 1G (galacturonic acid), H (enzymatic hydrolysed).	118
Figure 7: (A) Effect of pH on activity of Exo-PG; (B) Effect of pH on the stability of Exo-PG.	119
Figure 8: (A) Effect of Temperature on activity of Exo-PG; (B) Effect of temperature on the stability of Exo-PG.	119
Figure 9: "Half-life" of Exo - PG (60°C / 1 h).	120
Fig 10: Kinetics parameters of purified Exo-PG in citrus pectin (92% esterified) (A), with Ca ²⁺ (B).	120

LISTA DE TABELAS

I. INTRODUÇÃO

II. REVISÃO DA LITERATURA

III. CAPÍTULO I

IV. CAPÍTULO II

Table 1. Summary of treatment of crude enzyme with caulin.....64

Table 2. Summary of purification of *Penicillium viridicatum* RFC3 polygalacturonase by solid state fermentation of wheat bran and orange bagasse.....64

Table 3. Effect of some metal ions on the PG activity65

V. CAPÍTULO III

Tabela 1: Dados utilizados para a análise de variância da produção de Exo-PG produzida pelo *P. viridicatum* RFC3 através de FSM.76

Tabela 2: Análise de variância da produção de Exo-PG através da fermentação submersa (FSM) de vários meios de cultivo.94

Tabela 3: Teste de Tukey para as médias dos meios de cultivo, pH e tempo de fermentação, utilizados nos ensaios fermentativos para a produção de Exo-PG.	94
Tabela 4: Análise de variância da produção de Exo-PG através da fermentação submersa (FSM) de várias diluições de água amarela.	99
Tabela 5: Teste de Tukey para as médias da água amarela, pH e tempo de cultivo, utilizados nos ensaios fermentativos para a produção de Exo-PG.	99
Tabela 6: Análise de variância da produção de Exo-PG através da fermentação submersa (FSM) de Água Amarela (sem diluição) e Bagaço de Laranja Batido.....	100
Tabela 7: Teste de Tukey para produção de Exo-PG através da fermentação submersa (FSM) de Água Amarela (sem diluição) e Bagaço de Laranja Batido.....	100

VI. CAPÍTULO IV

Table. 1. Summary of purification of polygalacturonase by <i>Penicillium viridicatum</i> RFC3	115
Table. 2. Effect of some metal ions on the PG activity	115

RESUMO

A poligalacturonase (PG) é uma pectinase que degrada a molécula de pectina atuando internamente, ao acaso, liberando oligossacarídeos (Endo-PG) ou por ataque a partir da extremidade não redutora da cadeia, liberando moléculas de ácido galacturônico (Exo-PG). As pectinases, como várias outras enzimas, têm sido obtidas a partir de microrganismos, em processos fermentativos em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSM). A purificação e caracterização destas enzimas podem possibilitar o estudo das diferenças de suas propriedades funcionais, bem como, permitem avaliar suas possibilidades de aplicação, em diferentes condições, em processos industriais. Este trabalho teve por objetivos estudar a produção, purificação e caracterização da PG produzida por *Penicillium viridicatum* RFC3 através de FES e FSM. Para FSM foram testados os resíduos agroindustriais (farelo de trigo, bagaço de laranja, uma mistura de ambos) a 3% (p/v) além da água amarela (resíduo do processamento da indústria cítrica) no seu estado bruto e com diluições (2, 4 e 10x). Os pHs iniciais foram corrigidos para 4,5, 5 e 5,5 e a fermentação ocorreu por 24 - 96 h. A ANOVA mostrou que o extrato do bagaço de laranja (pH 5,5 e 96 h) foi o melhor meio para a produção da PG em FSM. A purificação da PG produzida em FSM iniciou-se pela ultrafiltração do extrato bruto (membranas de 50 e 10 kDa, respectivamente) seguida pela aplicação da amostra em uma coluna de filtração em gel Sephadex G75 e posterior aplicação em uma Q Sepharose. A fração isolada e desorvida revelou, após

eletroforese (PAGE-SDS) a homogeneidade da banda cuja massa molar foi estimada em 92,24 kDa e pI de 5,4. A enzima mostrou ser uma exopoligalacturonase (Exo-PG) com pH e temperatura ótimos em 5,0 e 50-55°C. A enzima mostrou-se ainda dependente de Ca^{+2} que aumentou a atividade e estabilidade. O K_m da enzima foi de 1,30 e 1,16 mg/mL em presença de Ca^{+2} . A V_{max} foi de 1,76 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ e 2,07 quando o íon Ca^{+2} foi adicionado.

Para a FES, as condições de fermentação revelaram que o farelo de trigo misturado ao bagaço de laranja (1:1 – p/p), a 80% de umidade como meio de cultivo após 336 h, permitiram a maior produção de Exo-PG. A purificação da enzima iniciou-se com um tratamento prévio da solução enzimática bruta com o caulin (40mg/mL), ultrafiltração seguindo-se a filtração em gel sephadex G-50, obtendo uma PG com massa molar de 24KDa e um pI de 6,5. A enzima mostrou ser uma Exo-polimetilgalacturonase com pH e temperatura ótimos de 6,0 e 60°C, respectivamente. Além disso, mostrou-se dependente de Ba^{+2} que aumentou sua termoestabilidade. O K_m da enzima 1,82 e 1,40 mg/mL em presença de Ba^{+2} . A V_{max} foi de 81 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ e 55,16 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ em presença e ausência de Ba^{+2} , respectivamente.

ABSTRACT

The polygalacturonase (PG) is a pectinase that degrades pectin acting internally, releasing oligosaccharide (Endo-PG) or by attack to a non-reducing chain extremity, releasing galacturonic acid (Exo-PG). The pectinases, like many other enzymes, have been obtained from microorganisms by solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SMF). The purification and characterization of these enzymes besides the study of differences of its functional properties permit its application on industrial processes, on different conditions. This work aimed the study of production, purification and characterization of PG from *Penicillium viridicatum* RFC3 by SSF and SMF. In SMF they were assayed agroindustrial wastes (wheat bran, orange bagasse and a mixture of both) at 3% (w/v – 1:1) and citric industry liquid waste (yellow water) in crude state and with dilutions (2, 4 and 10x). It was also evaluated the variation of the initial pH of the medium (4.5, 5.0 and 5.5) and the time of fermentation (24 – 96 h). The ANOVA test revealed that the culture medium composed by orange bagasse extract, at pH 5.5 and 96 h, was the best condition for production of PG in SMF. The purification process of PG from SMF was carried out by the ultrafiltration of the crude extract (50 and kDa membranes, respectively) and by gel filtration in Sephadex G75 and Q Sepharose columns. The fraction with PG activity shown by electrophoresis (SDS-PAGE), an homogeneity of a band with estimated molar mass of 92.24 kDa and pI 5.4. The enzyme revealed to be an Exo-PG with optimal pH and temperature of 5.0 and 50-55 °C. It also revealed to be Ca²⁺ dependent, which increased its

activity and stability. The K_m of the enzyme was 1.30 and 1.16 mg/ml on Ca^{2+} presence. The V_{max} was 1.76 and 2.07 μ mol/min/mg when Ca^{2+} was added.

The better fermentation conditions in SSF was wheat bran mixed with orange bagasse (1:1 – w/w) at 80% moisture as an culture medium and 336h of fermentation. The PG purification was started after previous treatment of crude extract with caulin (40 mg/ml), ultrafiltration and posterior loaded on a gel filtration Sephadex G50, which revealed one PG with molar mass of 24 kDa and pl of 6.5. The enzyme was an Exo-PG with optimal pH and temperature of 6.0 and 60°C, respectively. Besides, the Ba^{2+} increases its thermostability. The K_m was 1.82 and 1.40 mg/ml on Ba^{2+} presence. The V_{max} was 81 μ mol/min/mg and 55.16 μ mol/min/mg in presence and absence of Ba^{2+} , respectively.

I. INTRODUÇÃO

As pectinases constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécticas presentes no material vegetal, através de reações de despolimerização (hidrolases e liases) e desesterificação (pectinesterases) (FOGARTY e WARD, 1974; ROMBOUTS e PILNIK, 1992).

Preparados de enzimas pectinolíticas têm uma ampla aplicação industrial. Na indústria de alimentos, as pectinases atuam na extração, clarificação e despectinização de sucos de frutas e extração de óleo vegetal, na produção de vinhos e na maceração de vegetais para a produção de pastas e purês (ÇINAR, 2005; KASHYAP et al., 2001). Estas enzimas também são utilizadas na fermentação do café, cacau e fumo (MASOUD e KALTOKT, 2006; PANDEY et al., 2000a). Na indústria têxtil, têm sido empregadas na maceração do linho e no tratamento de fibras têxteis brutas, como a juta e o rami, por facilitarem a liberação das fibras de celulose após a quebra da pectina (ROLDÁN et al., 2006).

Os processos de fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando resíduos agro-industriais são economicamente interessantes, tanto pela conversão destes resíduos em produtos de alto valor agregado, quanto pela obtenção de pectinases, as quais apresentam uma série de propriedades importantes do ponto de vista industrial.

Substratos como o bagaço de laranja e o farelo de trigo mostraram-se bons indutores de pectinases, em fermentação semi-sólida. Altas quantidades

de pectinases foram produzidas pelo fungo *Penicillium viridicatum* RFC nesses meios, além de terem sido detectadas várias isoformas de PGs, com massas molares semelhantes. Entretanto, não há referência na literatura se o mesmo ocorre quando esse fungo é cultivado em FSM (SILVA et al., 2002).

Visto que os dois processos fermentativos apresentam características importantes que devem ser levadas em consideração para a obtenção de enzimas microbianas, torna-se necessário avaliar, sob aspecto comparativo a produção das enzimas em ambos os processos, levando-se em conta principalmente a eficiência na produção, as isoformas produzidas, além das propriedades bioquímicas das enzimas obtidas em cada um.

O entendimento da estrutura e da estabilidade das poligalacturonases produzidas por diferentes microrganismos quando purificadas podem revelar importantes informações sob os pontos de vista científico e biotecnológico (DEVI e RAO, 1996; SILVA, 2003).

A eficiência na purificação de proteínas depende da seleção de técnicas apropriadas. A escolha destas técnicas visa aperfeiçoar o desempenho, maximizar o rendimento e minimizar o número de passos requeridos para o isolamento da proteína de interesse (LINN, 1990; ALMEIDA e KURTENBACH, 2002).

Assim, o presente trabalho teve como objetivos:

? Purificar uma das isoformas de PG obtida através da FES nas condições descritas anteriormente por Silva *et al.*, 2005;

? Avaliar fontes de carbono, pH e o tempo de fermentação para a produção de poligalacturonase, pelo fungo *Penicillium viridicatum* RFC3, através da FSM;

? Selecionar as melhores condições de produção para a FSM e purificar a PG;

? Purificar uma das isoformas de PG obtida da FSM;

? Caracterizar físico-quimicamente as enzimas purificadas da FSM e FES quanto a:

- o Massa molar e ponto isoelétrico (pI);

- Especificidade ao substrato e produtos de hidrólise;
- Efeito de íons sobre a atividade e estabilidade enzimática;
- pH e temperatura ótimos e de estabilidade, além da meia vida;
- Parâmetros cinéticos K_m e V_{max} ;

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Fermentação em estado sólido (FES) e submersa (FSM)

Fermentação, sob o ponto de vista biotecnológico, pode ser definida como a transformação de um substrato em um determinado produto pela ação de microrganismos e pode ser desenvolvida por processos submerso ou sólido (MITCHELL et al., 2000; SILVA, 2003). A maior diferença entre estes dois bioprocessos é a quantidade de água livre no substrato. A fermentação em estado sólido (FES) também designada por fermentação em substrato sólido ou ainda por fermentação semi-sólida, envolve o crescimento de microrganismos em substratos sólidos em ausência (ou próxima dela) de água visível entre as partículas do substrato. A água presente no meio geralmente está fortemente adsorvida às partículas sólidas. Na fermentação submersa (FSM), a atividade de água é muito alta e o meio, quando diluído, pode alcançar um grande volume, quando comparado ao meio semi-sólido. Em FSM a água chega a constituir cerca de 90-99% da massa total do material a ser fermentado (HÖLKER e LENZ, 2005; RAGHAVARAO et al., 2003; SILVA, 2003).

Segundo Pandey et al. (2000a) e Mitchell et al. (1992), a fermentação em estado sólido pode ter como fonte de carbono e energia apenas o substrato (fermentação em substrato sólido) ou estar associada a um outro material usado como suporte sólido inerte (fermentação em estado sólido).

A fermentação submersa (FSM) é um sistema empregado industrialmente para a produção de uma grande variedade de metabólitos de origem fúngica, com grande importância sócio-econômica, chegando a movimentar cerca de US\$ 9 bilhões/ano entre antibióticos, enzimas, ácidos e outros, (GIBBS et al., 2000). O processo de fermentação submersa, utilizando fungos filamentosos, é influenciado por diversos fatores, os quais vão desde o crescimento e obtenção de biomassa até a produção de metabólitos.

Assim como na fermentação submersa (FSM), o processo de fermentação em estado sólido (FES) é afetado por vários fatores além da atividade de água (a_w) do substrato, que geralmente está abaixo de 0,99. A transferência de calor é restrita, principalmente quando envolve uma fermentação em grande escala e, neste caso, a evaporação se torna um fator preponderante para o esfriamento do meio. Os substratos são mais concentrados em FES do que em fermentação submersa (FSM) e muitas vezes precisam de um pré-tratamento para que o microrganismo possa acessar os nutrientes disponíveis nos mesmos.

A a_w é um fator extremamente importante num bioprocessos, pois geralmente o crescimento microbiano e a atividade de enzimas são inibidos, quando a água livre do meio é diminuída a níveis críticos. Usualmente, a diminuição da a_w aumenta a fase lag de crescimento de um microrganismo, até tal ponto que este pára de crescer resultando em menor quantidade de biomassa. Em geral, bactérias requerem um valor de a_w alto ($>0,9$). Já os fungos competem com mais sucesso em a_w mais baixas ($>0,8$) (MITCHELL e LONSANE, 1992).

O sucesso de um processo fermentativo depende diretamente do crescimento microbiano e de sua atividade sobre o substrato. A maneira com que o microrganismo degrada a partícula e o "pool" de enzimas necessário a essa degradação devem ser considerados (SILVA, 2003).

Tanto a FES como a FSM são amplamente afetadas pela agitação do substrato. Na FES, a agitação melhora a dispersão de calor, CO_2 , O_2 e umidade. Porém, quando são utilizados fungos filamentosos, a agitação do substrato pode levar ao rompimento das hifas e liberação de metabólitos intracelulares afetando a produção e a estabilidade de outros metabólitos

produzidos durante o processo fermentativo (KHANAHMADI et al., 2006; MITCHELL, 2002).

No processo de fermentação submersa (FSM), quando ocorre aumento da escala, a viscosidade causada pelo uso de fungos filamentosos pode gerar sérios problemas, pois é necessário empregar uma força maior para homogeneizar e melhorar a aeração no meio (GIBBS et al., 2000). Porém, em escala laboratorial, essa homogeneização não é garantida totalmente e o meio de fermentação tende a tornar-se heterogêneo com a formação de regiões estagnantes no fermentador, que nada mais são do que aglomerados de micélio fúngico que se aderem à parede ou a qualquer outra região do fermentador. Conseqüentemente, a distribuição de nutrientes torna-se, assim como as limitações de O₂, um problema para as fermentações aeróbicas (McNEIL e HARVEY, 1993; GIBBS et al., 2000). A agitação na FSM está ainda relacionada com a forma como o micélio se desenvolve, o qual pode se dispersar livremente no meio de cultivo, ou emaranhar-se de maneira a formar aglomerados macroscópicos, na forma de “pellets” (METZ et al., 1979; CHANG e OLLIS, 1982). A diminuição do comprimento da hifa e o aumento das ramificações ocorrem com o aumento da agitação e, conseqüentemente, com a diminuição da viscosidade do meio (MAKAGIANSAR et al., 1993; PETRUCIOLI et al., 1995).

O modelo de crescimento dos fungos em substratos sólidos é único para cada substrato, pois este depende da penetração das hifas na partícula, assim como, da própria composição do mesmo. VARZAKAS et al. (1997), observaram um crescimento de 2 mm das hifas em 40 h de cultivo em grãos de soja enquanto que SANGSURASAK et al. (1996) e GUTIÉRREZ-ROJAS et al. (1997) observaram 2 tipos de crescimento micelial durante a fase vegetativa. No primeiro, parte do micélio cresceu na superfície do substrato enquanto outro penetrou no substrato de forma a colonizar totalmente as fibras e grãos.

Na fermentação submersa observa-se um crescimento mais rápido do microrganismo, porém um dos primeiros fatores que são observados durante a fermentação utilizando fungos é a supressão da formação de conidióforos e esporos, decorrente de um aumento do stress do fungo no meio (GIBBS et al., 2000; SMITH, 1978).

Devido às atividades metabólicas dos microrganismos e, dependendo da espessura da camada de substrato, uma grande quantidade de calor pode ser produzida durante o processo fermentativo. Como a temperatura afeta a germinação dos esporos, o crescimento, a esporulação dos microrganismos, o metabolismo e a formação do produto, o calor produzido deverá ser dissipado para evitar danos à fermentação. Essa dissipação de calor pode ser feita através da circulação forçada de ar ou por outro sistema que impeça o aquecimento (LONSANE, 1985). A temperatura mostra-se bastante variável num processo de FES, como no caso do cultivo de *A. oryzae* em arroz na produção do koji quando os conidiósporos, primeiro espalham-se pelo meio e a temperatura é mantida constante entre 30 e 32°C, faixa ótima para a germinação. Após 1 dia de fermentação, a temperatura se eleva gradualmente até 35°C. Em seguida, o meio é amassado, misturado e espalhado de forma que tenha um crescimento uniforme sobre a "cama" e, após 2 dias de cultivo, a temperatura máxima do koji chega a 40°C (SATO e SUDO, 1999).

Na FSM, a dispersão do calor produzido é feita pela agitação do meio. O problema de transferência de calor também pode ser resolvido com uma jaqueta de água externa ou através da inserção de tubos ou espirais de resfriamento. Porém, se o meio na região periférica do fermentador se move muito lentamente ou permanece estagnado, o controle da temperatura torna-se dificultado; além disso, um emaranhado fúngico cria um micro-ambiente cuja temperatura pode ser diferente daquela do meio (PORCEL et al., 2005; MACNEIL e HARVEY, 1993; GIBBS et al., 2000).

Outro fator a ser considerado é a tensão de O₂ e CO₂ no meio. SATO e SUDO (1999) reportaram que uma taxa de oxigênio menor que 0,2% não afetou o crescimento de *Aspergillus oryzae* em grãos de arroz cozido, todavia, a fase lag de germinação foi aumentada pela baixa concentração de oxigênio, enquanto que uma alta taxa de CO₂ (>10%) inibiu o crescimento. Posteriormente RAHARDJO et al., (2005) relataram também que taxas de O₂ a 0,25% causaram uma redução drástica no crescimento das hifas e conseqüentemente no tamanho da colônia do *A. oryzae* em meio sólido PDA causando o aumento da fase lag em mais de 5h e diminuindo a produção de enzimas. VILLEGAS et al. (1993) reportaram que a produção de protease ácida por *A. niger* foi acelerada numa concentração de 4% de CO₂.

DORAN (1995) ressalta que a transferência de oxigênio no meio de FSM para as células ativas é um fator crítico para as fermentações aeróbicas, pois este, na forma mais solúvel, é escasso no meio, isto é, chega a concentrações de $8,69 \text{ mgL}^{-1}$ em água, a 25°C . A transferência de massa de oxigênio no meio é ainda mais complexa em se tratando de meios mais viscosos, pois este deve ser transferido através do meio de fermentação a partir do local onde está sendo injetado até regiões de intenso metabolismo, ou seja, no interior das células. Muitas vezes, a forma como o O_2 se dispersa no meio pode ser restrita a determinadas regiões do fermentador, levando a um aumento do volume das bolhas no meio, tornando-o mais viscoso, e dificultando a transferência de oxigênio do meio para as células (BAI et al., 2003; OOSTERHUIS e KOSSEN, 1984; MÔO-YOUNG et al., 1987; GIBBS et al., 2000). As conseqüências dessa limitação vão desde a supressão ou total inibição da produção de metabólitos como enzimas, ácidos orgânicos e antibióticos (VARDAR e LILLY, 1982; ZHOU et al., 1992).

Mudanças no teor de oxigênio dissolvido expresso em $p\text{O}_2$, podem diretamente influenciar a produção de metabólitos em diversos fungos (GIBBS e SEVIOUR, 1998). Todavia estudos reportam que a $p\text{O}_2$ não exerce grande influência sobre a morfologia fúngica. A confirmação de que isto não ocorre foi obtida por VAN SUIJDAM e MERTZ (1981). Estes autores variaram o $p\text{O}_2$ do meio de cultivo do *Penicillium chrysogenum* de 12 para 300 mmHg, em condições de batelada, e observaram que a relação glicose x comprimento da hifa x ramificação parece não ter relação alguma com o $p\text{O}_2$ do meio. Contudo, OSVIK E KRISTIANSEN (1992) relatam que o $p\text{O}_2$ também se relaciona com as condições reológicas do meio de fermentação, pois variações na sua difusão causam mudanças na resistência e flexibilidade da hifa.

A produção de CO_2 em grandes quantidades é comum em algumas fermentações aeróbicas em conseqüência da atividade respiratória da célula e sua presença (CO_2) influencia na morfologia fúngica. Em fermentações do tipo batelada o pH controlado ($\sim 6,5$), baixos $p\text{CO}_2$ ($\sim 3\text{-}5\%$ saturação) aumentam a ramificação do fungo *Penicillium chrysogenum*. O aumento do $p\text{CO}_2$ ($\sim 15\text{-}20\%$ saturação) podem levar ao inchaço, raquitismo e alta ramificação das hifas e, às vezes, à formação de pellets miceliais (HO e SMITH, 1986; McINTYRE e

McNEIL, 1998). Outros estudos mostram que a presença de CO₂ dissolvido estimula a síntese de quitina nas regiões apical e sub-apical da hifa o que está ligado ao aumento da ramificação e plasticidade das hifas (EDWARDS e HO, 1988; McINTYRE e McNEIL, 1998).

Em relação ao controle do pH durante a FES, é um dos pontos mais críticos, sendo dificilmente conseguido, devido à heterogeneidade e a consistência do material. Como tentativa de amenizar o efeito da variação brusca do potencial hidrogeniônico, são utilizados substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções tampão durante a etapa de umidificação do substrato. Muitas vezes esses substratos necessitam de uma fonte complementar de nutrientes como a amônia ou uréia. Porém, quando esse último é adicionado ao meio, sua hidrólise libera amônio que rapidamente alcaliniza o meio de cultivo (LONSANE, 1985). Na fermentação submersa (FSM) o pH é controlado pela adição de ácido/álcali diretamente ao meio fermentativo e o local onde ocorrerá esta titulação deve ser escolhido de maneira cuidadosa principalmente em fermentações pouco agitadas que poderão acarretar na demora ou incorreções no pH desejado durante o controle do processo. Os efeitos deste processo, acrescido de uma limitação de nutrientes, tendem a aumentar o nível de stress celular levando a morte do microrganismo (HUMPHREY, 1998; GIBBS et al., 2000).

O pH do meio também afeta a morfologia fúngica, porém a importância deste fator sempre foi alvo de muitas controvérsias na literatura. PIRT e CALLOW (1959) observaram que a frequência na ramificação e no diâmetro das hifas de *Penicillium chrysogenum* geralmente aumenta em pHs acima de 6,0-7,4; no entanto, VAN SUIJDAM e METZ (1981), em condições de fermentação por batelada, não notaram influência alguma do pH na morfologia deste mesmo fungo.

SHU e LUNG (2004) também relatam que variações no pH influenciam no crescimento celular, biosíntese e tamanho dos exopolissacarídeos produzidos pelo *Antrodia camphorata* em FSM utilizando meios constituídos por glicose, extrato de levedura e malte e utilizando erlenmeyers e fermentadores de 5 L. Para cada pH analisado o fungo respondeu de maneira diferente crescendo melhor no meio com pH corrigido para 4,0 enquanto que os exopolissacarídeos

foram produzidos em maior quantidade em pH 5,0 porém, esses mesmos exopolissacarídeos obtiveram uma maior variação em suas massas molares quando o microrganismo foi cultivado em pH mais baixo (3,0).

MILES e TRINCI (1983) relatam que as condições máximas de crescimento do *P. chrysogenum* ocorreram em pH 6,0 e que a produção de biomassa diminuía à medida que este pH aumentava. Porém, cepas diferentes de *P. chrysogenum* podem ter respostas diferentes com relação ao crescimento, quando submetidas a condições de cultivo e de controle de pH semelhantes. Esses dados levam a concluir que o crescimento do fungo não responde somente ao pH, mas a vários fatores que concomitantemente interagem entre si (VERLENT et al., 2005; GIBBS et al., 2000). SILVA et al. (2005) observaram variações no pH do meio de fermentação de *P. viridicatum* e sugeriram que a redução inicial observada estaria relacionada à produção de ácidos orgânicos, nas primeiras horas de fermentação e que a alcalinização subsequente poderia ser decorrente da degradação de fontes de nitrogênio liberando amônio ou ao consumo dos ácidos produzidos.

O tamanho da partícula é outro fator a ser considerado. Partículas pequenas geralmente constituem uma maior superfície para o ataque microbiano, facilitando a penetração das hifas e liberação de exo-enzimas que proporcionam a degradação do substrato. Porém, em FES se o tamanho da partícula for muito pequeno, estas podem provocar a compactação do meio e diminuição dos espaços interpartículas e interferir na aeração do meio e respiração microbiana, levando a um aquecimento e resfriamento desbalanceados. Por outro lado, uma superfície muito grande pode melhorar a aeração e respiração, mas dificultar o ataque do microrganismo à partícula (SARRETTE et al., 1992; KAR et al., 1998).

Geralmente o substrato sólido é naturalmente mais concentrado em relação a carboidratos e proteínas do que quando comparado a um substrato líquido. Em FSM a água constitui cerca de 90-99% da massa total enquanto que na FES essa massa varia de 10-85%. NA FSM essa concentração de substratos solúveis e produtos podem alcançar altos níveis, estes potencialmente aumentam os efeitos inibidores e repressivos no microrganismo. Logo, a FES necessita de um tempo de cultivo muito maior

quando comparado a FSM principalmente no que se refere à produção de proteínas por fungos lignocelulósicos (SHAH et al., 2005; MITCHELL e LONSANE, 1992).

Os microrganismos podem produzir uma grande variedade de enzimas hidrolíticas extracelulares em FES e FSM como pectinases, celulasas, amilases, proteases entre outras (COUTO e SANROMÁN 2006; SILVA et al., 2002; SATO e SUDO, 1999).

1.1. Vantagens e desvantagens da FES e FSM

Conforme discutido anteriormente, os meios para a FES são geralmente mais complexos em termos de composição química, porém de fácil acesso e com baixo custo, além de constituir resíduos da indústria, agricultura e outras atividades humanas, os quais, na maioria das vezes, contêm todos os nutrientes necessários ao crescimento microbiano, e não necessitam de um pré-tratamento. Na FSM o meio de cultura também pode ser constituído por resíduos da agroindústria, mas na maioria dos casos são compostos químicos de origem conhecida e complementados com fontes de carbono e nitrogênio adicionais. A principal diferença entre a FES e FSM é a a_w . Uma alta a_w da FSM faz com que o meio possa fluir livremente pelo biorreator dispersando de maneira homogênea os nutrientes e o microrganismo (MITCHELL e LONSANE, 1992; RIZZATO, 1999; SILVA, 2003; PANDEY, 2003). Por outro lado, a baixa a_w , característica da FES, pode ser favorável considerando esta como um fator de inibição para possíveis contaminantes, especialmente bactérias e leveduras. Essa baixa a_w ainda pode reverter em características diferentes dos produtos obtidos como, por exemplo, uma glucosidase de *Aspergillus phoenicis* produzida em FES é mais termotolerante que aquela obtida em FSM (DESCHAMPS e HUET, 1984; SILVA, 2003).

O nível de trocas gasosas também é considerado muito diferente nos dois processos. A aeração forçada é mais fácil de ser usada em FES devido aos espaços interpartícula o que facilita a troca gasosa entre as superfícies, porém, esse tipo de aeração pode criar caminhos preferenciais, dificultando a dispersão homogênea do oxigênio, CO₂ e calor no meio. Em FSM, esta

questão pode ser facilmente contornada com o uso da agitação (HÖLKER e LENZ, 2005; BAJRACHARYA e MUDGETT, 1980; GIBBS et al., 2000).

O uso de esporos como inóculo, facilita uma dispersão mais uniforme do fungo pelo meio e sua concentração pode afetar a formação e morfologia do pellet na FSM, ou seja, uma baixa concentração de esporos irá gerar pellets lisos e compactos enquanto o aumento da concentração irá gerar pellets “focos” e menos agregados (GIBBS et al., 2000). Em relação à FES, concentrações diferentes de esporos modificam o tempo de germinação e crescimento dos microrganismos (MITCHELL e LONSANE, 1992). RAIMBAULT e ALAZARD (1980) puderam comprovar a influência do inóculo na FES de farinha de mandioca por *A. niger*. Concentrações de 10^6 a 10^7 esporos/g substrato foram consideradas ideais, cuja germinação ocorreu em até 10h de cultivo. Quando utilizadas concentrações maiores (10^8 esporos/g) foi observada uma germinação imediata, porém, associada a um baixo crescimento do fungo. Uma análise microscópica revelou que uma proporção considerável de esporos não germinou nestas concentrações.

A FES apresenta algumas desvantagens em relação a FSM. A produção de metabólitos indesejáveis causados pelo aquecimento do substrato, em FES pode se tornar um grande problema durante a fase de crescimento do microrganismo, especialmente quando o processo se dá em larga escala o que não ocorre em FSM, pois o calor gerado pelo microrganismo se dispersa mais facilmente com a agitação do meio (HÖLKER e LENZ, 2005; MITCHELL e LONSANE, 1992; TREVELYAN, 1974).

Substratos sólidos naturais usados na FES são um problema no que se referem à reprodutibilidade e monitoramento do processo como a manutenção do pH, concentração e conteúdo do substrato (SILVA et al., 2002). O que não ocorre na FSM na qual, normalmente, os tipos de fontes e concentrações dos nutrientes e suas concentrações são conhecidas facilitando a reprodutibilidade (CUI et al., 1998).

A avaliação da biomassa produzida é um parâmetro fundamental para a caracterização do crescimento microbiano. Porém, sua quantificação diretamente em FES envolve técnicas complicadas e imprecisas. Quando fungos filamentosos são usados as hifas penetram na partícula impossibilitando sua determinação direta. Na FSM uma amostra do meio em fermentação

possibilita uma estimativa deste crescimento através de uma separação simples da biomassa e do meio de cultivo (COUTO e SANROMÁN, 2006; MOO-YOUNG et al., 1983; ASAFF et al., 2006).

A transferência de massa é um processo que pode ocorrer nas fases sólida, líquida e gasosa em FES. Na fase gasosa, o oxigênio pode ser transferido para o local de atividade microbiana enquanto o CO₂ ou outro gás inibidor da atividade é removido. Nas fases sólida e aquosa, os nutrientes dissolvidos no meio fazem com que as enzimas produzidas migrem para as partículas sólidas e os produtos formados são levados para longe do local da reação. Porém, a limitação do processo de difusão intrapartícula, devido a uma correlação de fatores como tamanho da partícula, porosidade e fluxo dos gases, pode ser um fator limitante ao crescimento microbiano, enquanto que em FSM esta transferência é facilitada pelo fato de ocorrer apenas na fase líquida e pela agitação do meio (MOO-YOUNG et al., 1983; CUI et al., 1998; GIBBS et al., 2000).

Os cultivos em FES freqüentemente são longos e o crescimento é baixo quando comparado à conversão do substrato, porém, a produtividade volumétrica pode ser similar ou maior que na FSM (MITCHELL e LONSANE, 1992).

1.2. Substratos utilizados em FES e FSM

De acordo com a fonte de carbono utilizada pelos microrganismos, os substratos podem ser divididos em três grupos: aqueles que contêm amido, aqueles que contêm celulose e lignocelulose e aqueles que contêm açúcares solúveis como fonte de carbono. Os substratos amiláceos que podem ser utilizados em FES incluem arroz, mandioca, farelo de trigo, farelo de arroz, sementes de trigo-mouro, milho, resíduos de batata doce e de banana. Um pré-tratamento do grão de cereal como moagem, raspagem ou corte faz com que o tamanho das partículas dos grãos sejam reduzidos a milímetros de diâmetro, evitando a compactação da partícula, comum em materiais constituídos por partículas pulverizadas (SONIA et al., 2005; LEE et al., 2006; MITCHELL e LONSANE, 1992).

O amido em sua forma natural, com suas longas cadeias de amilose e amilopectina, dificilmente é degradado por microrganismos a monômeros de açúcar para serem assimilados. Ao sofrer tratamento térmico, o amido se gelatiniza tornando-se mais solúvel e passível de ser degradado e assimilado pelo microrganismo (MITCHELL et al., 2000).

A fermentação com substratos amiláceos pode ser prejudicada pelo aumento da viscosidade do substrato, que pode causar uma aglomeração das partículas durante os processos de FES, especialmente se o substrato for misturado a outros materiais. Essa compactação pode reduzir a troca de ar do meio e prejudicar o crescimento microbiano (MITCHELL et al., 2000).

Vários substratos lignocelulósicos têm sido investigados visando à aplicação em FES. Substratos sólidos como palha de trigo, palha de milho e arroz, polpa de madeira, tem sido testados (SHAH *et al.*, 2005; ELISASHVILI et al., 2006).

A hidrólise da celulose requer a ação sinérgica de várias enzimas que constituem o complexo celulolítico. Em muitas situações, o material celulósico empregado como substrato é parcialmente degradado durante o processo fermentativo, resultando em um composto de fibras mais acessíveis e enriquecido em proteínas microbianas com excelentes propriedades de uso como componentes de ração animal (SHARMA e SATYANARAYANA, 2006, SHAH et al., 2005).

Substratos lignocelulósicos podem ser submetidos a tratamentos prévios como cozimento a vapor ou tratamentos com ácidos e álcalis para quebrar a estrutura da celulose e lignina, o que aumenta a superfície para o ataque do microrganismo. A lignina normalmente não serve como fonte de carbono e energia, para a maioria dos microrganismos a não ser que fungos ligninolíticos atuem na sua degradação ou o mesmo sofra tratamento prévio (KANG et al., 2004; COUTO e SANROMÁN 2006).

Os substratos sólidos contendo açúcares solúveis incluem a polpa de uva, sorgo doce, beterraba doce, restos de abacaxi, polpa de café, casca de manga e banana, entre outros. Entretanto, tem sido demonstrado que esses materiais, por possuírem altos teores de açúcares redutores prontamente assimiláveis pelo microrganismo, promovem a repressão catabólica de enzimas despolimerizantes, além de suas partículas altamente higroscópicas se

compactarem fortemente reduzindo a troca de calor e gases. Uma estratégia para contornar esse problema é misturar esses substratos com materiais sólidos inertes como bagaço de cana ou linho (SONIA et al., 2005; SILVA et al., 2002; MARTINS et al., 2002).

OOIJKAAS et al. (2000) utilizaram suportes inertes associados a meios de cultivo definidos e observaram que os primeiros foram fatores cruciais para o sucesso da FES. O uso de substratos inertes sintéticos é vantajoso na FES em relação ao substrato natural, pois permite uma reprodutibilidade muito maior, facilitando o controle dos processos e o monitoramento das variáveis a serem estudadas, como pH, a_w , temperatura, CO_2 e O_2 . Comercialmente, esses substratos inertes dependem de fatores como custos do meio, do tipo de fermentador, do processo de “downstream” e valor comercial do produto a ser obtido.

Como substratos inertes naturais e sintéticos podem-se usar vermiculite, perlite, grânulos de barro, amberlite, polietileno e espuma de poliuretano, além de bagaço de cana-de-açúcar, de milho, casca de arroz, etc. Estes últimos só são adequados a processos nos quais os microrganismos usados têm pouca ou nenhuma atividade celulolítica ou lignolítica (OOIJKAAS et al., 2000). Sistemas com suporte inerte podem ser aplicados para a produção de vários produtos como esporos fúngicos, na formulação de bioinseticidas; produção de ácidos giberélico, cítrico, L-glutâmico; antibióticos, como enzimas (lipases, nucleases, amilases, pectinases, celulasas, etc) (OOIJKAAS et al., 2000).

SOARES et al. (2000) produziram aromas de frutas por fermentação em estado sólido usando casca de café suplementada com diferentes concentrações de glicose, produzindo variadas intensidades de aromas de frutas como abacaxi e banana. Quando suplementadas com solução salina, óleo de soja ou leucina foi obtido um aroma de banana.

VANDENBERGHE et al. (2000) utilizaram substratos como bagaço de mandioca, casca de café e bagaço de cana na produção de ácido cítrico por FES.

PANDEY et al. (2000b) discutem a importância do aproveitamento do resíduo de mandioca (30-50% amido) nos processos biotecnológicos como produção de enzimas, ácidos orgânicos, alimentos e cogumelos, por FES. Esse resíduo de mandioca é facilmente degradado por microrganismos sem

tratamento prévio. PANDEY et al. (2000a) destacam também, a importância da casca e polpa de café nos processos biotecnológicos. Por apresentarem compostos como cafeína, taninos, derivados fenólicos, catequinas, ácidos isoclorogênicos dentre outros, esse substrato rico, é utilizado nos processos fermentativos na produção de enzimas, aromas, enriquecimento protéico, produção de cogumelos, fertilizantes, alimento para gado e peixes. A hidrólise da casca de café também é viável para a obtenção de xilose, arabinose, frutose, glicose e maltose.

Substratos como torta de óleo de oliva e bagaço de cana-de-açúcar podem ser utilizados em FES na produção de lipases em colunas de Raimbault (CORDOVA et al., 1998). Assim como a farinha da semente de algodão que pode ser utilizada como fonte protéica para ração animal após ação da *Cândida tropicalis* que degrada o gossypol em até 92% eliminando quase que totalmente seu efeito tóxico sobre o crescimento e a fertilidade de animais monogástricos (WENG e SUN, 2006).

Por outro lado, os meios de cultivo em FSM são formulados através da utilização de compostos quimicamente conhecidos que são conhecidos como meios sintéticos ou semi-sintéticos ou através do uso de matérias primas naturais. Em escala industrial a utilização de meios sintéticos torna-se muito cara e a opção geralmente é feita por matérias-primas provenientes da agroindústria (SANT'ANNA JR, 2001).

SANT'ANNA JR (2001) relata que a composição dos meios de cultivo utilizados industrialmente é sigilosamente guardada. A literatura apenas indica que constituintes complexos são empregados como, melaços, farinhas amiláceas, licores de milho, soja e outros cereais, além de farinhas de peixe e de sementes oleaginosas, gelatinas, extrato de levedura.

Em fermentações semi-industriais ou em escala laboratorial, comumente a sacarose e a glicose são as fontes de carbono preferenciais, porém de acordo com o produto a ser obtido, outras fontes de carbono podem ser empregadas como o xilano, pectina, celulose e amido. Muitas vezes estes meios são combinados a fim de se obter um bom crescimento e adaptação inicial do microrganismo ao meio, ou para estudar os mecanismos que regulam a fisiologia microbiana como indução e repressão catabólica (BIESEBEKE et al., 2002; CHO et al., 2002; SHAH e REDDY, et al., 2005). Resíduos agrícolas e

agroindustriais vêm sendo comumente empregados como fontes de carbono em processo submerso na tentativa de transformá-los ou degradá-los para que estes sejam aproveitados em rações animais, adubos, ou obtenção de bioprodutos. Estes tratamentos possibilitam uma diminuição de custos das indústrias e tenta solucionar problemas com o despejo de efluentes no meio (CAMMAROTA e FREIRE, 2006; SILVA, 2003; TAVARES et al., 1998).

Esta preocupação foi demonstrada por TAVARES et al. (1998), que utilizaram um resíduo líquido da indústria do processamento de suco de laranja, conhecida como água amarela, como meio para o cultivo do *Penicillium citrinum* para fins de depuração biológica e produção de enzimas, devido à alta quantidade de proteínas, óleos essenciais, pectinas, açúcares, ácidos orgânicos e sais presentes no mesmo.

HADJ-TAIEB et al. (2006) utilizaram resíduos agrícolas para a obtenção de produtos de interesse industrial. Para isso utilizaram uma cepa mutante de *Penicillium occitanis* com alta capacidade de produção de pectinases. Para a fermentação foram utilizadas a casca de laranja e a pectina de citrus o que proporcionou uma alta produção de pectinases, porém, quando foi utilizado um meio constituído apenas de uma pasta de trigo a produção destas enzimas foi muito superior.

BOTELLA et al. (2005) utilizaram um resíduo da viticultura, a polpa de uva, para a produção de enzimas hidrolíticas (celulases, xilanases e pectinases) pelo *Aspergillus awamori* demonstrando que a polpa de uva foi um resíduo com maior capacidade de indução para produção destas enzimas quando comparado aos outros resíduos usados.

Muitos dos meios utilizados na FES sendo eles naturais e principalmente os sintéticos, demandam uma fonte de nitrogênio complementar. Conforme destacado no trabalho de TAVARES et al. (1998) a farinha de soja, adubo mineral NPK (19:10:19) além sulfato e fosfato de amônio foram usados como fontes complementares de nitrogênio ao resíduo sendo observado um aumento da biomassa produzida e na redução de 55% da matéria orgânica, medida através da DQO (Demanda Química de Oxigênio).

GALLMETZER e BURGSTALLER (2002) estudaram o efeito da limitação de nutrientes como, amônio, nitrato e fosfato na secreção de ácidos orgânicos por *Penicillium simplicissimum*. Os autores observaram que a excreção de

ácidos aumentou quando o amônio foi restrito no meio (~6%) e que a maior produção de citrato ocorreu quando o fosfato foi um elemento limitante (~13%).

CUI et al. (1998) estudaram o crescimento do *Aspergillus awamori* a várias condições de aumento de escala (fermentadores de 2, 15 e 100 L) onde foram testadas algumas fontes de nitrogênio (como o cloreto de amônio e o extrato de levedura), e utilizaram como fontes de carbono glicose ou sacarose. A utilização de um meio onde todos os elementos e suas quantidades são conhecidas proporcionou um aumento de escala sem alterações significativas em fatores como a biomassa produzida, trocas de O₂ e CO₂.

2. Enzimas pectinolíticas

Pectinases foram uma das primeiras enzimas a serem usadas industrialmente. Sua aplicação industrial iniciou-se em 1930, na produção de vinhos e sucos de frutas. Essas enzimas são responsáveis pela degradação da longa e complexa cadeia de moléculas chamadas pectinas, que são polissacarídeos estruturais presentes na lamela média e na parede primária das plantas superiores (Fig. 1).

Atualmente, as pectinases são componentes dos processos das indústrias de processamento de sucos e nas indústrias têxteis chegando a constituir um mercado que movimentou U\$ 75 milhões de dólares em 1995, do total de U\$ 1 bilhão comercializado. Em 2005 estimou-se que o mercado de enzimas movimentou U\$ 1,7 a 2 bilhões de dólares (KASHYAP et al., 2001; SILVA, 2003).

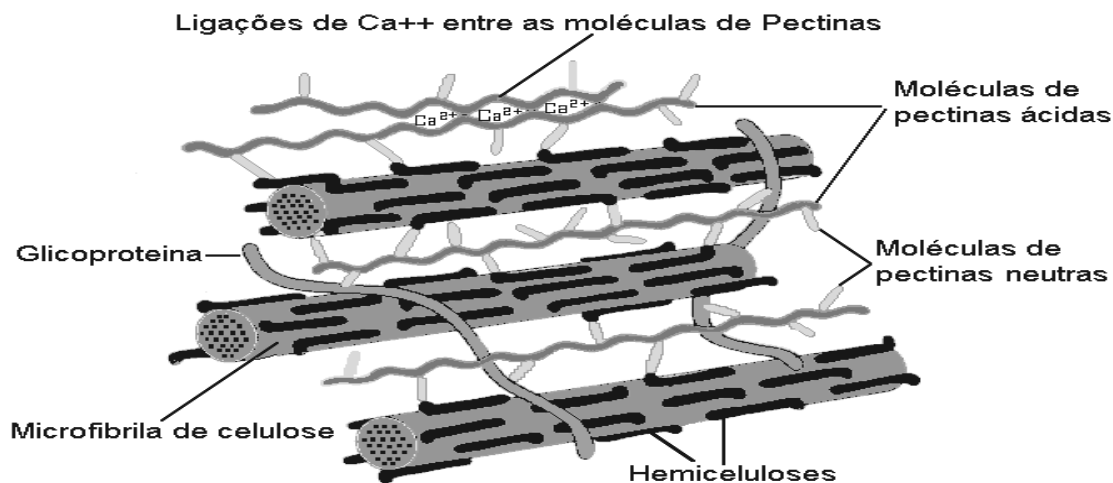


Figura 1: Estrutura esquemática da parede celular vegetal

Quimicamente as substâncias pécnicas são complexos coloidais de polissacarídeos ácidos, formados por cadeias de ácido galacturônico unidos entre si por ligações do tipo $\beta(1,4)$. Às cadeias de pectinas ainda podem aparecer ligadas a moléculas de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose (KASHYAP et al., 2001; JAYANI et al., 2005).

Os grupamentos carboxílicos do ácido galacturônico podem estar parcialmente esterificados com grupamentos metil ou estar parcial ou totalmente neutralizados por íons sódio, potássio ou amônia. Os C2 ou C3 podem ainda aparecer acetilados. De acordo com a modificação na cadeia, as substâncias pécnicas são classificadas em protopectina, ácido pécnico, ácido pectínico e pectina (BE MILLER, 1986).

As protopectinas são substâncias pécnicas insolúveis em água e encontradas nos tecidos de plantas, em frutas verdes. A partir dessas substâncias, são produzidas as substâncias pécnicas solúveis durante o amadurecimento das frutas. São pouco hidrolisáveis quando comparadas à pectina ou ácido pécnico (KILARA, 1982).

Ácidos pécnicos (ácido poligalacturônico) são galacturonanas que contêm quantidades desprezíveis de grupamentos metoxila enquanto que os ácidos pectínicos são galacturonanas que apresentam menos de uma quantidade >0 e $<75\%$ de metoxilação em suas cadeias (Fig. 2). Estes formam pectinatos que

são geralmente sais ácidos ou parecem com ácidos pectínicos que têm a propriedade de formar gel com açúcar e ácido (se o conteúdo de grupos metil forem adequadamente baixos) ou com combinações de sais de cálcio (KILARA, 1982).

Pectina é um nome genérico para uma mistura variada de componentes que apresenta um mínimo de 75% de metoxilação. Na sua forma natural a pectina localiza-se na parede celular vegetal (Fig. 1), interligando outros polissacarídeos estruturais e proteínas para formar a protopectina insolúvel (KILARA, 1982).

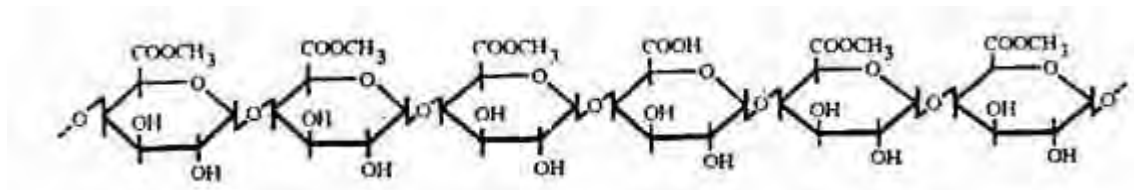


Figura 2: Estrutura da molécula de pectina (SERRA et al., 1992).

Num fruto verde, as cadeias de pectinas são unidas às microfibrilas de celulose para constituírem a parede celular vegetal. Tais pectinas são insolúveis e conseqüentemente, conferem rigidez à parede celular. Durante o amadurecimento, a estrutura da pectina é alterada pelas enzimas que ocorrem naturalmente nas frutas. Essas alterações envolvem a quebra da cadeia de pectina e a quebra de cadeias laterais contendo cadeias de ramnose, arabinose, o que faz com que a pectina se torne mais solúvel e sua “amarração” da parede celular se afrouxe e o tecido da planta se torne mais mole (KASHYAP et al., 2001).

As ações das poligalacturonases (PG), pectina esterase (PE), celulase e β -galactosidase foram estudadas por KETSA e DAENGGANIT (1999) que observaram sua ação durante o amadurecimento de durian (*Durio zibethinus*). A medida que o fruto amadurece, a firmeza deste diminui e a quantidade de água solúvel da pectina aumenta, coincidindo com o aumento da atividade da PG. As atividades da PE, β -galactosidase e celulase foram altas quando o fruto ainda estava verde, diminuindo à medida que este amadurecia. O mesmo foi

comprovado por ALI et al., (2004) para diversas frutas como manga, tomate, banana, carambola, goiaba e mamão onde observaram a solubilização da pectina e o aumento de poliuronídeos e demais carboidratos em até 340% em manga e 272% na banana após cerca de 6 a 10 dias de amadurecimento.

As substâncias pécticas constituem cerca de 0,5 - 4% do peso fresco do material. Quando o tecido vegetal é macerado, parte da pectina é arrastada junto com a fase líquida (forma solúvel) causando um aumento da viscosidade dos sucos. Por outro lado, outras moléculas de pectina remanescentes junto às fibrilas de celulose e cadeias laterais de hemicelulose facilitam a retenção de água na polpa (PIFFERI et al., 1989). A prensagem mecânica de frutas, ricas em pectina, apresenta baixo rendimento visto que parte do suco permanece ligado à polpa na forma de uma massa geleificada. Isto dificulta a extração do suco pela prensagem ou outros métodos mecânicos. (KASHYAP et al., 2001).

2.1. Classificação das pectinases

As enzimas pécticas são classificadas de acordo com a maneira que atacam a molécula de pectina. Existem dois grupos de enzimas pécticas: **desesterificantes** (pectina esterases) e, enzimas **despolimerizantes** (hidrolases e liases) além das **protopectinases** (Fig. 3) (ALKORTA et al., 1998; MACMILLAN e SHEIMAN, 1974; FOGARTY e WARD, 1974).

a) Desesterificantes ou Pectina esterases (PE) (EC 3.1.1.11) conhecidas também como pectina metil hidrolases (PME), desesterificam os grupamentos metoxílicos da pectina formando o ácido péctico, liberando metanol e H^+ , o que pode diminuir o pH do meio, servindo como critério para avaliação da atividade enzimática. Essa enzima é altamente específica para o metil éster do ácido poligalacturônico, enquanto que etil, propil e alil ésteres são atacados por algumas pectinaesterases, mas em taxas mais baixas. Essa enzima é inibida pelo ácido péctico, seu produto final de reação (PILNIK e RAMBOUS, 1981).

b) Despolimerizantes: são enzimas que rompem as ligações glicosídicas β (1,4) entre os monômeros de ácido galacturônico das substâncias pécticas, podendo atuar por hidólise (hidrolases) ou por β -eliminação (liases).

b.1) Hidrolases: Poligalacturonase (PG) e Polimetilgalacturonase (PMG) - são enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas β (1,4) no ácido péctico. Estas podem ser de como **endo-poligalacturonases (Endo-PG)** (EC 3.2.1.15) que atuam pela hidrólise das ligações glicosídicas β (1,4) internas do ácido galacturônico de forma aleatória, causando a despolimerização da molécula. São produzidas por uma grande variedade de organismos, como fungos, bactérias e leveduras, plantas superiores e nematóides parasitas de plantas. **Exo-poligalacturonases (Exo-PG)** (EC 3.2.1.67) são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas β (1,4) alternadas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora liberando monômeros de ácido galacturônico.

As **polimetilgalacturonases (PMG)** atuam preferencialmente na hidrólise das ligações glicosídicas β (1,4) internas entre os resíduos de ácido galacturônico, de pectinas altamente esterificadas. Estas também podem ser do tipo Endo-polimetilgalacturonase (Endo-PMG) e Exo-polimetilgalacturonase (Exo-PMG).

Embora existam alguns trabalhos descrevendo a atividade catalítica das polimetilgalacturonases, a existência de algumas destas enzimas parece ser questionável, uma vez que preparações de poligalacturonases, contaminadas com pectinesterases, podem ter sido descritas como sendo de polimetilgalacturonases (ALKORTA et al., 1998, MACMILLAN e SHEIMAN, 1974, FOGARTY e WARD, 1974).

b.2) Liasas: Pectina liases e Pectato liases (PL)

As liases, também chamadas de trans-eliminases, quebram as ligações glicosídicas de qualquer pectato, por ação endo ou exo-poligalacturonato liase, ou da pectina (endo e exo polimetilgalacturonato liase).

As polimetilgalacturonato liases (pectina liases) (EC 4.2.2.10) são enzimas que atuam na quebra da molécula de pectina por um mecanismo de trans-eliminação de hidrogênio, a partir da ligação entre os carbonos 4 e 5 do ácido

galacturônico. A sua ação provoca um aumento da absorvância a 235 nm, devido à formação de uma dupla ligação entre os carbonos envolvidos na reação. Estas podem ser divididas em:

A- endo-polimetilgalacturonato liases: catalisam de forma aleatória a ruptura das ligações α (1,4) da pectina. A enzima endo-PMGL é produzida quase que exclusivamente por fungos, tendo sido demonstrado sua ocorrência em apenas duas linhagens de *Erwinia* e uma de *Pseudomonas*.

B- exo-polimetilgalacturonato liases: catalisam a ruptura das ligações α (1,4) da molécula de pectina a partir da extremidade não redutora. Pectinas altamente esterificadas são os melhores substratos desta enzima, sendo que os ácidos pécticos não são degradados pela mesma. A exo-PMGL ainda não foi descrita em nenhum estudo (MACMILLAN e SHEIMAN, 1974; WHITAKER, 1990).

As poligalacturonato liases (pectato liases) (EC 4.2.2.2) são enzimas que apresentam uma ação semelhante à das polimetilgalacturonato liases, porém atuam sobre o poligalacturonato desmetoxilado (ácido péctico). Estas também são do tipo endo ou exo.

c) Protopectinases: atuam solubilizando a protopectina em presença de água, liberando e pectina altamente polimerizada da protopectina. Essas protopectinases têm alta especificidade por tri tetra e pentagalacturonatos, removendo-os a partir da extremidade redutora do açúcar.

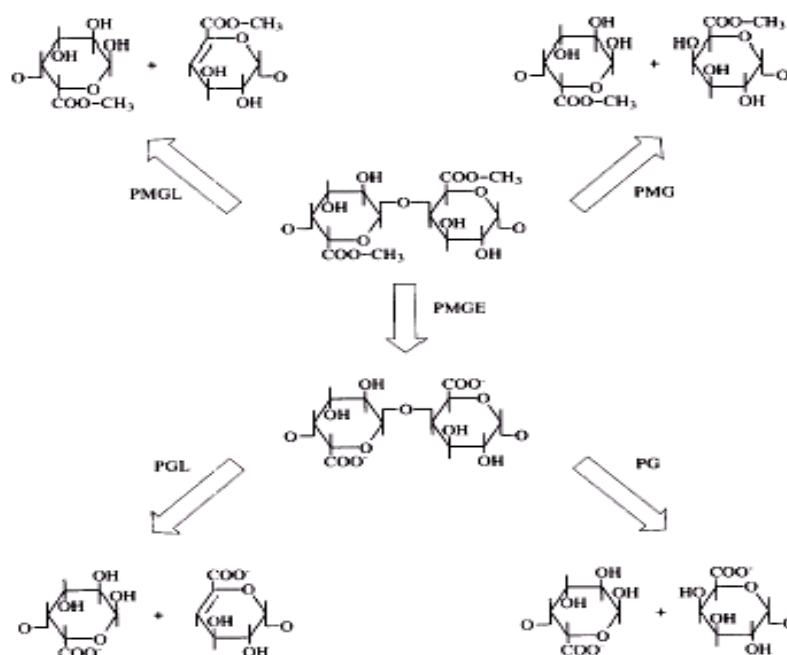


Figura 3: Ação das pectinases sobre as substâncias pécicas (SERRA et al., 1992). (PMGL – polimetilgalacturonase liase, PMGE, polimetilgalacturonase esterase, PMG – polimetilgalacturonase, PGL – poligalacturonase liase, PG – poligalacturonase)

2.2. Produção de pectinases

A produção de pectinases utilizando meios sintéticos e de composição definida permite um estudo mais detalhado dos mecanismos de indução e repressão enzimático como os realizados por TEIXEIRA et al. (2000) que estudaram o efeito de fontes de carbono na produção de pectinases sintetizadas pelo *Aspergillus japonicus* 586 em FSM. A produção de pectinases foi induzida em concentrações de pectina a partir de 0,2% até 0,5% em combinação com outros elementos como glicose, sacarose e glicerol. Quando em altas concentrações e atuando isoladamente, estes açúcares reprimiram a produção destas enzimas.

RUNCO et al. (2001) mostraram o efeito da fonte de carbono suplementada por alguns aminoácidos na regulação da produção de poligalacturonase em *Aspergillus terreus*, através de FSM. Para isso, utilizaram

como fontes de carbono o ácido poligalacturônico, glicose, frutose, galactose e aminoácidos como histidina, arginina, prolina, alanina, cisteína, isoleucina, serina e fenilalanina, além de inibidores transcricionais como a actinomicina D e a ciclohexamida. Em relação à fonte de carbono, a maior produção de PG ocorreu em meio contendo apenas o ácido poligalacturônico (5 g/L) a qual foi de 0,8 U/mL. Além disso a produção da enzima foi inibida quase que completamente em meios contendo apenas glicose, frutose ou galactose. Porém, esses mesmos meios, ao serem acrescidos do ácido poligalacturônico (indutor), notou-se um aumento a produção de PG (0,53 U/mL). Em presença de inibidores de transcrição como a actinomicina D e a cicloheximida a síntese de PG cessou gradativamente a medida que estes foram adicionados no meio durante as primeiras horas de fermentação, sugerindo que a tradução só ocorreria se um RNAm estivesse disponível no sistema. Quando aminoácidos foram utilizados notou-se que metionina, tirosina e principalmente leucina foram capazes de aumentar a síntese de PG em até 64%, enquanto histidina e arginina não tiveram efeito algum na síntese de PG. Já os demais aminoácidos atuavam de maneira inibidora na síntese de PG. Logo, a indução e/ou repressão da síntese de PG parece estar ligada ao nível de transcrição e tradução sendo afetada diretamente pela fonte de carbono disponível no meio e pela deficiência ou excesso de alguns aminoácidos no meio.

A utilização de fontes de carbono alternativas têm sido estudadas amplamente, evidenciando a importância da utilização de resíduos agrícolas e agroindustriais em processos fermentativos. Os trabalhos desenvolvidos por SILVA et al. (2002) e SILVA et al. (2005) com o *Penicillium viridicatum* RFC3 visando a produção de pectinases por FES utilizando resíduos agrícolas e agroindustriais com diferentes níveis de umidade (70 e 80%) mostraram que um tempo de cultivo de 336h foi requerido para a máxima produção de exo-PG (8,3 U/mL), em meio com 70% de umidade. Observaram ainda, que nesses meios complexos varias outras enzimas despolimerizantes foram produzidas ao longo da fermentação como celulasas, amilases e xilanasas.

BELDMAN et al. (1984), também utilizaram resíduos agro-industriais de cultivares de trigo, beterraba doce, arroz, cana-de-açúcar e batatas para produção de carboidratos fermentescíveis, e para a produção de enzimas como pectinases, celulasas e hemicelulasas.

HOURS et al., (1988) usaram a polpa de maçã como substrato para a FES na produção de pectinases por *Aspergillus foetidus*. A síntese de pectinases nesse processo mostrou estar relacionada ao crescimento microbiano, medido pela dosagem dos níveis de glucosamina (componente da parede celular fúngica) e ao consumo de açúcares como glicose e frutose ao longo do período fermentativo. Outro fator que influenciou a produção da enzima foi a limitação da oferta de O₂. O crescimento intenso do micélio na superfície do meio, juntamente com a compactação do meio interferiu na dispersão do oxigênio afetando assim o metabolismo do fungo.

YAKOBY et al. (2000) estudaram a indução de pectinases em *Colletotrichum gloeosporides* inoculado em abacate durante a variação do pH decorrente dos vários estágios do amadurecimento do fruto. A síntese de poligalacturonase e pectinaliase só teve início em pH 5,0 e aumentou gradativamente até o pH 5,7, coincidindo com o início da colonização do fruto pelo fungo. Os autores notaram que a produção de pectinases ocorreria num mecanismo dependente do pH, o qual afetaria os níveis de transcrição e tradução da enzima e ainda sugerem que enquanto estes níveis não fossem atingidos, as enzimas produzidas permaneceriam inativas dentro do micélio fúngico através de uma glicosilação em suas estruturas. A remoção da glicosilação e secreção de enzimas só ocorreriam quando as condições de pH fossem favoráveis.

ZHENG e SHETTY (2000) estudaram a produção de PG por *Lentinus edodes* em resíduos de polpa de morango, polpa de maçã, polpa de oxicoco (cranberry). A atividade máxima da enzima obtida após 40 dias de cultivo, foi de 29,4 U, 20,1 U, 14,0 U, respectivamente. Nesses experimentos, a atividade da PG aumentou com a adição de ácido poligalacturônico à polpa de maçã e de cranberry, e não havendo a mesma resposta quando o meio foi polpa de morango.

As enzimas produzidas em FES e FSM têm sido avaliadas sob o aspecto comparativo de suas propriedades bioquímicas e físico-químicas. SOLÍS-PEREIRA 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 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 sua 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, sugerindo a ocorrência de repressão catabólica neste último sistema e ausência no primeiro.

PATIL e DAYANAND (2005) estudaram a produção de PGs em FES e FSM por *Aspergillus niger* em meios constituídos pelo pó da semente de girassol descascada e cascas de sementes de grama verde, vermelha e uma variedade denominada “bengal”, acrescidas de fontes de carbono (glicose e sacarose) e nitrogênio (sulfato e fosfato de amônio). A maior produção de PGs ocorreu após 40 – 120 h em FSM e 90 – 120 h em FES a concentrações de 4% de glicose (FSM) e 6% de sacarose (FSS) e 0,3% de sulfato e fosfato de amônio (FES e FSM). Os resultados evidenciaram que o uso de fontes de carbono adicionais tornaram-se necessárias de acordo com o resíduo a ser utilizado e auxiliam o crescimento microbiano. Por outro lado, a adição de fontes de nitrogênio não exerceram uma influência significativa. A suplementação do meio com as cascas de sementes de grama verde proporcionou um melhor rendimento na produção de PGs por ser este material rico em nitrogênio e outros compostos minerais.

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 as mesmas apresentaram diferenças na estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura e nas taxas de afinidade pelo substrato. Quando expostas a 60°C por 30 minutos, a endo e exo-PG, obtidas através da FES, mantiveram cerca de 90 e 70% da atividade original, enquanto que aquelas obtidas por FSM mantiveram apenas 40% dessa 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.

DIAZ-GODINEZ et al. (2001) também fizeram um estudo comparativo da produção de pectinases em FES e FSM. Foram utilizados um meio sintético com e sem sacarose (4%) para a FSM. Para o cultivo em estado sólido utilizaram os mesmos meio descritos anteriormente só que a estes foi adicionado a espuma de poliuretano como suporte inerte. Em todos os meios foi variado a a_w em 0,99 e 0,96. Os resultados mostraram que a produção de PG, em FES, no meio sintético sem adição de sacarose foi 11x maior quando comparada ao obtido em FSM (7,1 U/mL para FES e 0,6 U/mL para FSM) a 0,99 de a_w . Já a adição de sacarose mostrou efeito repressor na FES com uma produção cerca de 4,5x menor de PG (0,35 e 1,70 U/mL com e sem sacarose respectivamente). Para a FSM e FES a a_w de 0,99 atuou de forma a melhorar, mas de maneira não significativa a produção de PG .

CROTTI et al. (1999) estudaram a produção de enzimas pécticas em FES e FSM por *Talaromyces flavus*, tendo como substratos resíduos da indústria de citrica. Em FSM o microrganismo produziu PG (5 U/mL) e Pectinaesterase (13 U/mL) quando o meio foi suplementado com pectina cítrica (0,5-0,8%). A produção das enzimas foi inibida quando a glicose (0,8%) foi adicionada ao meio. Em FES, foi utilizado como fonte de carbono a casca de limão, “pellets” da polpa de limão, “pellets” de laranja e casca de maracujá. O melhor meio indutor dessas enzimas em FES foi aquele contendo polpa do limão.

2.3. Purificação de pectinases

O desenvolvimento de técnicas e métodos para purificação de proteínas foi um pré-requisito essencial para muitos dos avanços feitos na biotecnologia. As técnicas usadas na purificação de proteínas variam desde procedimentos de precipitação até uso de resinas específicas, e freqüentemente, mais que uma estratégia de purificação é necessária para alcançar a pureza desejada. A chave para purificação de proteínas é selecionar as técnicas mais apropriadas, aperfeiçoar o desempenho destas para maximizar o rendimento e minimizar o número de passos requeridos. Porém, contaminantes, como pigmentos e resíduos celulares, podem estar presentes e problemas relacionados a solubilidade, integridade estrutural e atividade biológica da proteína ainda podem existir (LINN, 1990; ALMEIDA e KURTENBACH, 2002; HO et al., 2002).

CELESTINO et al. (2006) purificaram uma Exo-PG produzida pelo fungo *Acrophialophora nainiana* obtida de fermentação submersa através de uma combinação de ultrafiltração e filtração em gel seguida de troca iônica. Essa pectinase apresentou massa molar de 35,5 kDa e mostrou um pH e temperatura ótimos de 8,0 e 60°C. Além disso, a enzima purificada apresentou uma meia vida a 50°C por 7 dias. Quando a temperatura foi elevada para 60 e 70°C a meia vida caiu para 20 e 3 minutos, respectivamente. Outra característica apresentada foi a inibição da Exo-PG por íons divalentes como cálcio, ferro, cobre, zinco e manganês. O valor do K_m também foi determinado em 4,22 mg/mL.

COELHO et al. (1995) fracionaram e purificaram uma poligalacturonase, produzida pelo *Aspergillus niger 3T5B* em FES de farelo de trigo a 60% de umidade, através da concentração via “salting-out”, seguido de filtração em gel utilizando gel Sephadex G-100. A amostra obtida após 48 h de cultivo, foi precipitada com 70% de sulfato de amônia, dialisada e aplicada novamente na mesma coluna. A enzima eluída num único pico e já purificada apresentou, por eletroforese, uma massa molar de cerca de 34,7 kDa.

YAO et al. (1996) observaram que para purificar a poligalacturonase produzida por *Penicillium expansum*, inoculado em maçã, foram necessários até cinco passos antes de se obter uma enzima pura. Porém, a purificação partiu do tecido decomposto do fruto (extrato bruto), com grande quantidade de matéria orgânica, seguido ao processo de precipitação com sulfato de amônio e centrifugação. O sobrenadante obtido foi submetido a um processo de ultrafiltração em membranas com corte de 10 kDa. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi concentrado com um sistema “stirred-cell” também de corte de 10 kDa e 1mL da amostra misturada a anfólitos para determinação do pI da enzima (8,10). Finalmente, frações da PG foram, dialisadas (remoção dos anfólitos) e submetidas ao processo de troca catiônica utilizando uma coluna Mono S HR5/5 para obtenção da enzima pura que, apresentou uma massa molar de cerca de 34KDa.

Muitos trabalhos visam principalmente a determinação da massa molar de pectinases e para isto utilizam técnicas como a cromatofocalização para a determinação do pI, seguido da eletroforese em gel de poliácridamida desnaturante o que resulta num baixo rendimento em proteína. CHELLEGATTI

et al. (2002) purificaram uma poligalacturonase produzida por *Penicillium frequentans* em FSM. A enzima bruta foi aplicada em coluna DEAE-Sephacell (1,8 x 60 cm) e a fração enzimática PII, entre seis separadas, eluída em concentração de 20 mM de NaCl, foi coletada, dialisada e reaplicada em DEAE-Sephacell (1,6x26,5cm). O cromatograma mostrou que esta tratava-se de uma enzima com massa molar de 74,1 kDa. Como características físico-químicas a enzima apresentou pH e temperatura ótimos de 3,9 e 50°C, respectivamente, e um pI de 4,2 e alta especificidade ao substrato com um K_m de 0,68 g/L e uma V_{max} de 596,8 U/mg.

As poligalacturonases microbianas apresentam diferentes massas molares, sugerindo que muitos microrganismos apresentam não um único gene, mas uma família gênica que pode codificar várias PGs que variam desde 360 aminoácidos até uma massa molar de 74 kDa. Além disso, estas podem ser induzidas por mecanismos diferentes como derivados de pectinas liberadas pela ação de Endo-PG, que por sua vez, pode ser constitutiva, ou induzida (LANG e DÖRNENBURG, 2000).

SINGH e RAO (2002) purificaram as poligalacturonases produzidas pelo *Aspergillus niger*. A enzima bruta foi adquirida da Novo Nordisk S/A e foi submetida a diálise e posterior aplicação em coluna de troca iônica CM-Sephadex C-50. Foram obtidos 4 picos, dos quais o 2º e o 4º, após diálise e concentração, foram aplicados em coluna de gel filtração Sephadex G-50 Superfine. As frações enzimática puras apresentaram massas molares de 61 kDa, para a PG-II e 38 kDa, para a PG-IV.

A purificação e estudos bioquímicos de poligalacturonases têm sido realizados por SAKAMOTO *et al.* (2002) purificaram duas exopoligalacturonases do fungo mesofílico *Aspergillus niger*. A exo-PGI manteve 75% da atividade original quando exposta a 60°C por 30 minutos, enquanto que a exo-PG II manteve apenas 25%. Cabanne e Donèche (2002) purificaram duas poligalacturonases (uma endo e uma exo) de outro mesofílico, o fungo *Botrytis cinera*. Estas enzimas também mostraram ser inibidas pela presença de íons Ca^{+2} .

SILVA et al. (2003) separaram parcialmente as exo-PGs e Pectina liases produzidas pelo fungo *Penicillium viridicatum* RFC3 em fermentação em estado

sólido de resíduos agrícolas. Os autores observaram que várias PGs e Pectinases eram produzidas ao longo do processo fermentativo.

NITURE e PANT (2004) mostram que variações do meio e do sistema fermentativo (sólido e submerso) possibilitaram a expressão de uma isoforma de poligalacturonase (PG-II) de *Fusarium moniliforme* não observada quando o fungo foi cultivado em meio líquido. Essa isoforma produzida em meio semi-sólido apresentou características como massa molar de 30,6 kDa, pH e temperatura ótimos de 5,3 e 40°C e pI de 8,6, além de K_m e V_{max} de 0,166 mg/mL e 13,33 μ mol/min/mg. Estas características são muito semelhantes à isoforma presente em ambos os processos fermentativos designada como PG-I que tem massa molar de 38 kDa, pH e temperatura ótimos de 4,8 e 45°C e pI de 8,1 além de um K_m e V_{max} de 0,111 mg/mL e 111,11 μ mol/min/mg.

SERRAT et al. (2002) purificaram uma poligalacturonase de *Kluyveromyces marxianus*, obtida da fermentação de um resíduo líquido do processamento do café acrescido de 10% de glicose. O processo submerso levou a produção de apenas uma poligalacturonase que foi separada em uma troca iônica utilizando a resina SP Sepharose. A enzima purificada apresentou massa molar de 41,7 kDa e pH e temperatura ótimos de 4,5 e 55°C.

SAKAMOTO et al. (2002) purificaram duas pectinases a partir de um preparado enzimático comercial de *Aspergillus niger*. O processo de purificação apresentou um rendimento final muito baixo 0,02 e 0,21% para as exo-PG1 e exo-PG2. Além disso, as duas enzimas apresentaram pesos distintos com 82 e 56 kDa. Porém, ao serem tratadas com uma endoglicosidase suas massas molares caem para 71 e 43 kDa indicando que estas possuem carboidratos ligados ao N-terminal. Este carboidrato teria um papel fundamental na atividade enzimática ocasionando uma redução de até 61% na atividade após sua remoção.

SAITO et al. (2004) relatam que a pectinase produzida pelo *Rhizopus oryzae* NBRC4707, em fermentação em estado sólido de casca de laranja, também apresentam carboidrato ligado ao N-terminal e que após a hidrólise da enzima pura com uma endoglicosidase H houve também a remoção deste carboidrato ocasionando a diminuição de sua massa molar que era de 31 kDa para 29,7 kDa.

Análises filogenéticas em PGs têm mostrado que as apesar de variações na composição da estrutura da enzima, suas funções biológicas permanecem e essas variações têm sido estudadas por CERVONE et al. (1978) e D'OVIDIO et al. (2004) que relatam existir um grau de similaridade na composição dos aminoácidos das poligalacturonases de plantas e microrganismos (fungos e bactérias). Esta similaridade relaciona-se à estrutura do sítio ativo da enzima onde alguns aminoácidos são altamente conservados em fungos, bactérias e plantas e que seriam responsáveis justamente pela atividade catalítica da mesma (SANTEN et al. 1999).

Essas regiões conservadas nas poligalacturonases que fazem parte do sítio ativo são observadas em três regiões específicas, descritas por SHIMIZU et al. (2002), e seriam responsáveis pela ligação da enzima com a molécula de galacturonatos. SANTEN et al. (1999) relatam que outros dois aminoácidos situados anteriormente ao Asp-Asp (que faz parte do sítio ativo), a Asn e outro Asp, estariam possivelmente relacionados com a estabilização da estrutura protéica (CHO et al., 2001).

A composição dos aminoácidos de poligalacturonase de diferentes organismos analisados levou JAMBON et al. (2003) e MARKOVIC e JANECEK (2001) a sugerirem um processo de evolução convergente para a família das glicosil-hidrolases, no qual estas poligalacturonases assumiriam composições diferentes, exceto no sítio ativo e quando comparadas estruturalmente, estas apresentariam forma tridimensional semelhante, acentuando a hipótese de que durante o processo evolutivo houve uma convergência e seleção dessa estrutura proteica, que é a mais eficaz para a quebra da molécula de pectina, cuja estrutura se dispõe linearmente. Além disso, várias classes de enzimas, mesmo não tendo uma relação evolutiva, usam conjuntos estruturalmente semelhantes de resíduos catalíticos para efetuar as suas reações químicas.

2.4. Aplicação de pectinases

As enzimas pécticas usadas na indústria de sucos e vinhos são geralmente obtidas de fungos, especialmente da espécie *Aspergillus niger*. As indústrias têm utilizado essas enzimas no processamento de sucos como maçã, pêra, uva, ameixa, tomate, além dos sucos cítricos, durante a etapa de

extração ou para a remoção de resíduos de pectina e diversas outras impurezas além de clarificar o suco produzido (LEE et al., 2006; LOUW et al., 2006; KAUR et al., 2004).

O suco de maçã prensada não sofre filtração e nem clarificação inicial, o qual apresenta uma alta concentração de polpa. Esse suco escuro é centrifugado e as partículas grossas são removidas, pois não podem ser filtradas. A etapa final do tratamento corresponde à clarificação e ao tratamento enzimático para remoção de pectina de modo a se obter um suco com coloração âmbar (KASHYAP et al., 2001).

SILVA (2003) estudou a ação das pectinases, produzidas pelo *P. viridicatum* RFC3 em sua forma bruta e parcialmente purificada, na extração dos sucos de banana, maçã e cenoura. Foi observado que a enzima bruta, obtida após 14 dias de fermentação, foi capaz de aumentar em 107% a extração do suco de banana, 55% de suco de maçã e 28,5% de suco de cenoura, em relação ao controle (extração sem aplicação de enzima). Quando usada enzima parcialmente purificada, o rendimento foi significativo apenas para a extração do suco de maçã não havendo diferenças na extração para os sucos de banana e cenoura. Logo, a utilização de um extrato enzimático contendo não só pectinases, mas um pool de outras enzimas possibilita um melhor rendimento na extração de sucos do que quando comparado a fração parcialmente purificada.

O suco da laranja é obtido por meio de extratoras que cortam e prensam a laranja separando o suco de outros materiais como membrana dos gomos, albedo e casca, que são direcionados a um tubo coador. Este suco é rico em material insolúvel e, a retirada deste material por meio de peneiramento (finisher) é importante para a qualidade final do suco de laranja. Este resíduo separado constitui uma polpa que ainda retém boa quantidade de suco o qual pode ser 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 e submetido à ação da pectinase visando a degradação da pectina. Neste processo, a enzima indicada é a endo-PG que baixa rapidamente a viscosidade do suco (CROAK e CORREDIG, 2006). Depois da despectinização o suco é submetido ao evaporador 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. Esse suco corresponde a 5-6% do volume do suco de laranja processado na fábrica e é empregado como base cítrica nas indústrias de bebidas e balas, tendo portanto valor comercial (CANTO e MENEZES, 1995).

No processamento de morango, framboesa e amora, a produção de um suco claro e concentrado requer o uso de pectinases para evitar a formação de géis de pectina, o que dificulta o processamento (clarificação, filtração e concentração). Estes sucos também podem conter a β -1,3-1,6 glucana, que forma uma goma e reduz a filtração e clarificação do suco, também requerendo a aplicação de β -glucanases (KASHYAP et al., 2001).

O suco de manga é processado na forma de purê ou néctar e várias misturas com outras bebidas. Um típico néctar de manga contém 20-30% de purê, pH de 3,5 e acidez titulável 0,2 - 0,3%. As enzimas como pectinases, celulasas e hemicelulasas são adicionadas para aumentar o rendimento na extração do suco, concentrá-lo e clarificá-lo (JAYANI et al., 2005).

O néctar de damasco possui uma concentração de 86% de células da fruta, 5% de resíduos celulares e 4% de outros agregados. O uso de enzimas pécnicas em conjunto com celulasas possibilita uma homogenização do néctar e estabilização deste, uma vez que a adição de enzimas em separado não é capaz de realizar (KAPOOR et al., 2001).

A goiaba, produzida principalmente no Sul da África, Índia, Havaí e América do Sul pode ser processada na forma de néctar, sucos, xaropes, geléias. A polpa dessa fruta é tratada com enzimas como pectinesterase, arabanase, hemicelulase, tanase e celulase, as quais aumentam o rendimento na extração do suco. Esse grande número de enzimas empregadas devido ao alto nível de resíduos celulares presentes na polpa, mesocarpo, parênquima e pericarpo do fruto (KASHYAP et al., 2001).

No processamento do mamão papaia, o fruto é convertido numa polpa semilíquida que contém enzimas como pectina metil esterase (PME) e PG endógenas, mas o uso de enzimas ainda é necessário para a total despectinização do produto (JAYANI et al., 2005).

O abacaxi para ser processado e enlatado, necessita ser cortado em fatias ou cubos, e o suco claro e concentrado pode ser usado para cobrir as fatias e cubos nas latas na forma de calda. O suco do abacaxi pode ser obtido como um subproduto drenado do maquinário que fatia o fruto ou pelos próprios frutos que são pequenos demais para serem cortados. O suco é despectinado (50°C, 20 - 30 minutos), pasteurizado e resfriado. Já a banana é muito mais apreciada pelo seu sabor e aroma do que pelo suco produzido. O suco puro é feito para ser misturado a outros sucos devido à grande viscosidade da polpa da banana. Essa polpa para chegar num produto ideal e poder ser aplicada necessita passar por um branqueamento, para inibir a polifenol oxidase causadora do escurecimento enzimático, além de ser tratada com dióxido de enxofre (100 ppm). O produto obtido possui um pH ótimo para a ação de pectinases que atuam ao mesmo tempo em que a banana é macerada, diminuindo a viscosidade da polpa. Após o processo, a polpa é prensada, clarificada ou centrifugada antes da concentração (BAKER e WICKER, 1996).

III. CAPÍTULO I.

Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3

*Denis Silva, Kivia Tokuioshi, Eduardo da Silva Martins, Roberto Da Silva, Eleni Gomes **

*Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Instituto de Biociências Letras e Ciências
Exatas (IBILCE),

Rua Cristovao Colombo, 2265, Jd. Nazareth, São José do Rio Preto, S.P., Brazil, cep 15054-
000, phone +55 17 32212393, fax +55 17 32212390. e-mail: eleni@ibilce.unesp.br

Received 25 May 2004; received in revised form 3 November 2004; accepted 8 January 2005

Process Biochemistry 40 (2005) 2885–2889

Abstract

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, 8.90 U 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.

Keywords: Pectinase; Solid-state fermentation; *Penicillium viridicatum*; Orange bagasse

1. 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.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and inoculum

The microorganism used was *P. 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.

2.2. Medium for solid substrate fermentation (SSF) and enzyme production

The composition and processing of the solid substrate has been described previously [11]. Briefly, 10 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 20 cm x 30 cm polypropylene packs, sterilized at 120°C for 40 min and hydrated with 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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 2 days, one flask and one pack was removed and the fermented material in each was mixed with 8mL distilled water per gram of substrate, stirred for 30 min, filtered and centrifuged. The supernatant was used as crude enzyme solution.

2.3. Measurement of reducing and total sugar

The total sugar content was measured by adding 2 N HCl to an aliquot of sample (1:1, v/v) and boiling for 10 min to hydrolyze the sugar. The hydrolyzate was neutralized with NaOH 2 N. The reducing sugar content was determined by the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method [12].

2.4. Enzyme activity measurements

2.4.1. 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 carboxymethyl-cellulose (Merck) and soluble starch (Merck) as substrate, respectively. Polygalacturonase activity was determined with a 1% solution of pectin (Sigma) in 0.2 M 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.

2.4.2. Endo-polygalacturonase (endo-PG) was measured viscosimetrically by adding 2 mL of crude enzyme to 6 mL 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 min, after which its viscosity was determined with a Basic viscosimeter (Fungilab). The blank contained thermally-inactivated crude enzyme. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme that reduced the initial viscosity by 50% per min.

2.4.3. Pectin lyase (PL) was assayed by measuring the increase in absorbance at 235 nm of substrate solution (0.8 mL 1% citric pectin in 0.2 M 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].

2.4.4. 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 0.2 M 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 1 μmol of methanol released per minute under defined conditions. Enzyme production was expressed in units per milliliter of crude enzyme solution (U mL^{-1}) and in units per gram of substrate (U g^{-1}).

2.5. Statistical analysis

Data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using the factorial design 2 x2x7 (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).

3. Results

Results from the fermentation in Erlenmeyer flasks are shown in Fig. 1. Endo-PG production peaked between 96 and 144 h of growth, with a maximum activity of 0.7 U mL⁻¹ (or 5.6 U g⁻¹ of substrate), for both 70% and 80% initial moisture (Fig. 1a). Exo-PG activity was observed after 48 h of fermentation, with peak values at 336 h for initial moisture of both 70% (5.8 U mL⁻¹ or 46.4 U g⁻¹) and 80% (8.9 U mL⁻¹ or 71.2 U g⁻¹) (Fig. 1b).

The medium containing 80% initial moisture afforded higher PL production (60.0 U mL⁻¹ or 480 U g⁻¹) in the first hours of fermentation than that with 70% (39.3 U mL⁻¹ or 314.4 U g⁻¹). However, after 240 h of fermentation, the higher PL activity was obtained when the initial moisture content was 70% (79.7 U mL⁻¹ or 637.6 U g⁻¹) (Fig. 1c).

Fig. 2 shows data from fermentation in a polypropylene pack. Endo-PG production on substrates with 80% and 70% of initial moisture peaked at 48 and 96 h of growth respectively, but the maximum activities were very similar (0.88 U mL⁻¹ or 7.0 U g⁻¹ of substrate at 70% and 0.93 U mL⁻¹ or 7.4 U g⁻¹ at 80%) (Fig. 2a). Exo-PG activity was highest at 336 h in medium with initial moisture of 70% (8.3 U mL⁻¹ or 66.4 U g⁻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 U g⁻¹) (Fig. 2c). Comparing pectinase production in Erlenmeyer flasks and polypropylene packs, it was found that the latter afforded a higher enzyme level. It was observed that sugar present in the media fell to 20% of the initial value after 48 h fermentation in most of the assays (Figs. 1d and 2d). The pH of the medium rise 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% (Figs.

1d and 2d). Besides polygalacturonases and pectin liase, pectinester-ase (PE) was detected in the fermentation medium with a maximum activity of 26 U mL^{-1} , after 288 h of fermentation. Other hydrolytic enzymes were produced during the fermentation, including endoglucanase (CMCase), xylanase, and amylase (Fig. 3).

4. Discussion

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 favourable to PL production (1% level of significance). According to Hours et al. [7,8], substrate humidity between 80% and 90% was ideal for production of pectinases by *Aspergillus foetidus* grown on apple pulp. Highest pectinase activity was obtained by in a fermentation on corn and wheat bran with 70% moisture [18]. On the other hand, in the case of *A. niger* the best growth was obtained on media with moisture contents ranging from 50% to 55% [18] and an initial moisture content of 40% provided better conditions for production of pectinases than those of 25%, 55% and 70% [5].

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 flasks and polypropylene packs it was found that the latter afforded a higher enzyme level, suggesting it to be an appropriate recipient for scaled-up tests in relation to the quantity of substrate that will be fermented. However, the scale up imply in various physic parameters which may be considered.

The increase of pH of the medium (in both Erlenmeyer flask and polypropylene pack at 80% and 70% moisture) contrast with those presented [2,8], in which a decrease in the pH of the medium during the fermentation of apple pomace and citrus pectin was observed. However, it corroborated other

data from solid-state fermentation [1,11,16]. 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 not detectable and that protein and amino acids were not major carbon and energy sources in these fermentations, it is likely that uptake of acid is involved in this alkalinization.

Besides polygalacturonases and pectinase, pectinesterase (PE) was detected in fermentation medium. 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].

Although with low activity, the presence of endoglucanase (CMCase), xylanase, and amylase 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 enzyme 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 *P. viridicatum* RFC3 can be successfully cultured in a wheat bran and orange bagasse mixture (1:1, w/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.

Acknowledgements

We thank FAPESP – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – for financial support.

5. References

- [1] Acuña-Argüelles ME, Gutiérrez-Rojas M, Viniestra-González G, Favela-Torres E. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 1995; 43: 808–14.
- [2] Aguilar G, Trejo BA, Garcia JM, Huitrón C. Influence of pH on endo- and exopectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Can J Microbiol* 1991; 37: 912–7.
- [3] Albersheim P. Pectin lyase from fungi. *Methods Enzymol* 1966; 8: 628–31.
- [4] Castilho LR, Alves TLM, Medronho RA. Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. *Process Biochem* 1999; 34: 181–6.
- [5] Castilho LR, Medronho RA, Alves TLM. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol* 2000; 71: 45–50.
- [6] De Gregório A, Mandalari G, Arena A, Nucita F, Tripodo MM, Locurto RB. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. *Bioresour Technol* 2002; 83: 89–94.
- [7] Hours RA, Voget CE, Ertola RJ. Apple pomace as raw material for pectinase production in solid state culture. *Biol Wastes* 1988; 23: 221–8.
- [8] Hours RA, Voget CE, Ertola RJ. Some factors affecting pectinase production from apple pomace in solid-state cultures. *Biol Wastes* 1988; 24: 147–57.
- [9] Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresour Technol* 2001; 77: 215–27.
- [10] Mahmood AU, Greenman J, Scragg AH. Orange and potato peel extracts: analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme Microb Technol* 1998; 22: 130–7.
- [11] Martins ES, Silva D, Da Silva R, Gomes E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochem* 2002; 37: 949–54.
- [12] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 1959; 31: 426–8.
- [13] Nout MJR, Rombouts FM. Recent developments in tempe research. *J Appl Bacteriol* 1990; 69: 609–33.
- [14] Raimbault M, Alazard D. Culture method to study fungal growth in solid state fermentation. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 1980; 9: 199–209.

- [15] Rombouts FM, Pilnik W. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Process Biochem* 1978;18:9–13.
- [16] Silva D, Martins ES, Da Silva R, Gomes E. Pectinase production from *Penicillium viridicatum* Rfc3 by solid state fermentation using agricultural residues and agro-industrial by-product. *Braz J Microbiol* 2002; 33: 318–24.
- [17] Sparringa RA, Owens JD. Causes of alkalization in tempe solid substrate fermentation. *Enzyme Microb Technol* 1999; 25: 677–81.
- [18] Xia L, Cen P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from xylose industry. *Process Biochem* 1999; 34: 909–12.

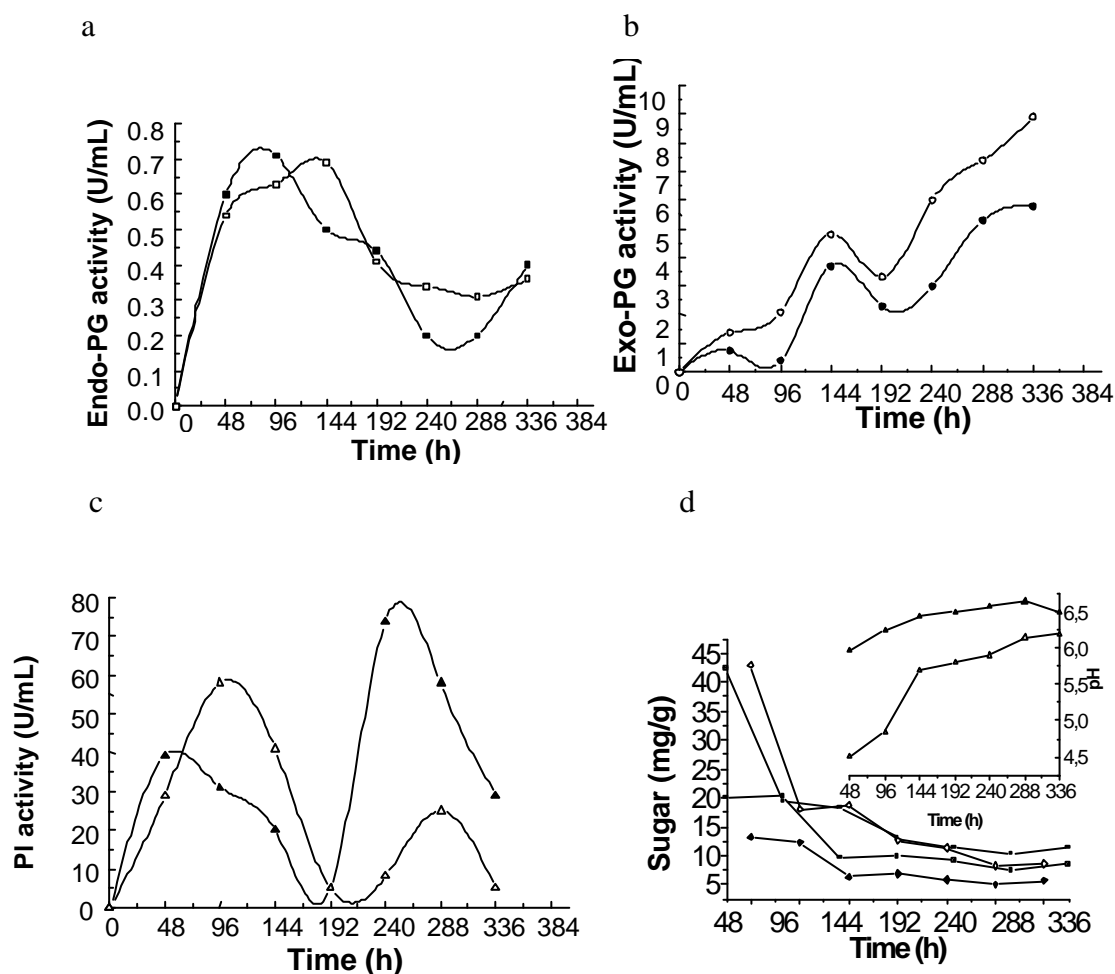


Figure 1: Production of pectinases in SSF using wheat bran and orange bagasse mixture (1:1) in Erlenmeyer flasks. a= Endo-PG; b= Exo-PG; c=PL; d= pH value and total (●, ▲) and reducing sugar (○, △).

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).

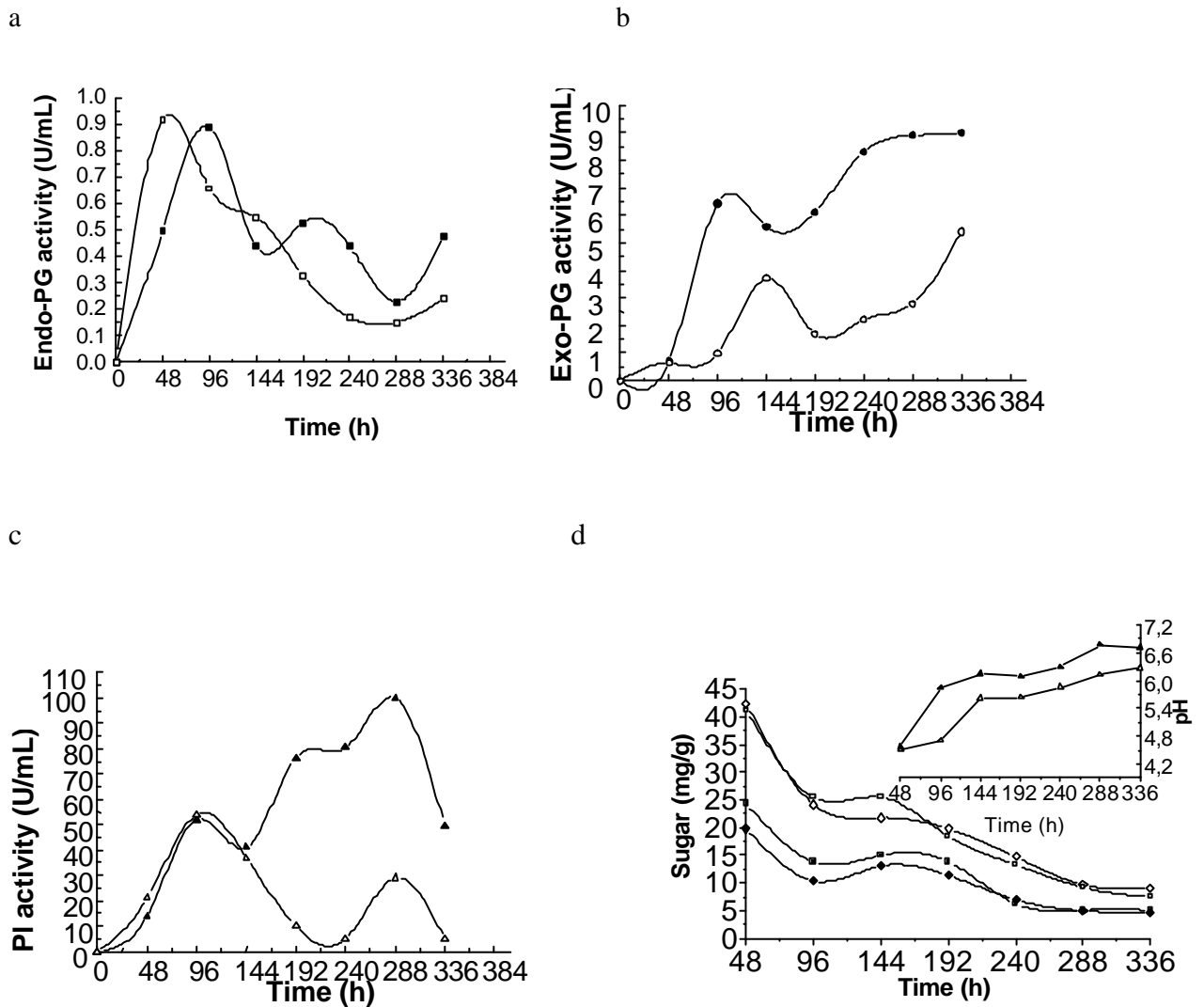


Figure 2: Production of pectinases in SSF using wheat bran and orange bagasse mixture (1:1w/w) in polypropylene pack a = endo-PG; b= exo-PG; c=PL; d= pH value and total (? , ?) and reducing sugar (◐, ◑).

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).

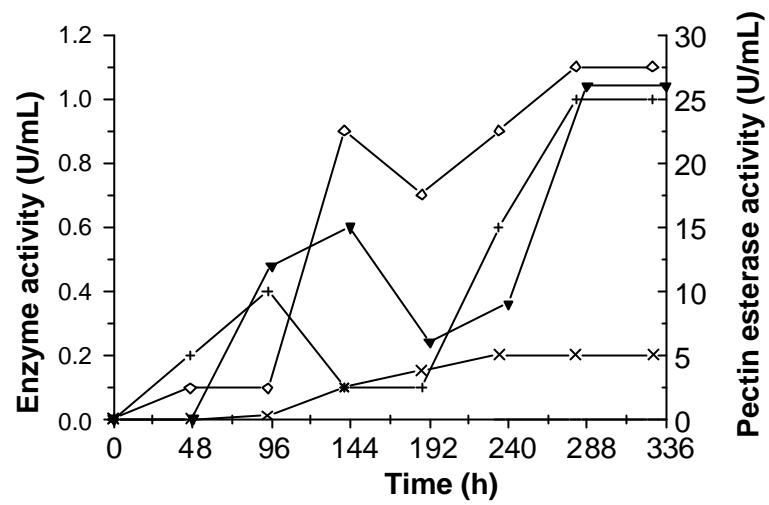


Figure 3: Hydrolytic enzymes produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid-state fermentation of mixture of wheat bran and orange bagasse (1:1 w/w).CMCase (-X-), xylanase (-○-), pectin esterases (-∇-) and amylase (-+-).

IV. CAPÍTULO II.

Production, purification, and characterization of a polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid state fermentation of agroindustrial waste

Dênis Silva^{1*}, Eduardo da Silva Martins¹, Rodrigo Simões Ribeiro Leite¹, Roberto da Silva¹, Eleni Gomes¹

¹ Unesp (State University of São Paulo), São Paulo, Brasil

* Corresponding author: Eleni Gomes, Unesp- IBILCE, Biology Department, Rua Cristovao Colombo, 2265, Jd. Nazareth, São José do Rio Preto, S.P., Brazil, cep 15054-000, phone +55 17 32212393, fax +55 17 32212390. e-mail: eleni@ibilce.unesp.br

Abstract

*The pectinolytic enzyme from *Penicillium viridicatum* obtained by solid state fermentation was purified to homogeneity by previous treatment with caulinTM (40mg mL⁻¹) following by column chromatography on Sephadex G50. The apparent molecular weight of the enzyme was 24KDa. Maximal activity occurred at pH 6.0 and at 60°C. The enzyme shown to be an exopolymetilgalacturonase, releasing galacturonic acid by hydrolisis of apple pectin. Ion Ba⁺² increased 96% of enzyme activity and 30% of it thermal stability. The apparent K_m with apple pectin as substrate was 1.82mg mL⁻¹ and the V_{max} was 81? mol min⁻¹mg⁻¹.*

Key Words: *Polygalacturonase, *Penicillium*, solid state fermentation, purification*

1. Introduction

Pectic substances constitute a complex of hetero-polysaccharides with a chain of α -1,4-linked galacturonic acid residues [1, 2, 3]. They exist in the middle lamella and primary cell walls of higher plants and have an important role in the structural organization of other cell-wall components. Because of large variety of pectins in plant material, there are many pectinolytic systems which can degrade them [4, 5]. There are three types of pectinolytic enzymes: de-esterifying, depolymerizing, and protopectinases [6, 7, 8, 9]. The enzymes depolymerizing polygalacturonic acid are further classified into polygalacturonase that hydrolyzing the α -1,4-linkage and polygalacturonate lyase cleaving by trans-elimination. Both include a random fashion endo-type hydrolyzing enzymes which release oligosaccharidic chains of variable lengths and exo-type enzymes which catalyze the release of single galacturonic acid residue from the non-reducing end [10, 23, 30, 37, 40].

Pectinases are used in industrial processes and have been produced and purified by solid state fermentation (SSF) using *Penicillium spp.* [5,11,7,33,37], *Aspergillus spp.* [15,16,17,28,34,36,40,41] *Fusarium spp.* [27,29], *Rhizopus oryzae* [10], *Thermoascus aurantiacus* [6], *Trichoderma reesei* [19], *Bacillus spp.* [26]. The knowledge of the biochemical characteristics of these enzymes and their isoforms is essential for the understanding of their structure and mechanism of action

The present paper reports the production, purification and physicochemical properties of an *Penicillium viridicatum* RFC3 polygalacturonase (PG) obtained by solid state fermentation using a mixture of wheat bran and orange bagasse.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and inoculum:

The microorganism used was *Penicillium viridicatum* RFC3 which was 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 of this solution, equivalent to 10^7 spores per gram of substrate, was used as inoculum.

2.2. Medium for solid state fermentation (SSF) and enzyme production:

The composition and processing of the solid substrate has been described previously [5,11]. Briefly, 10g aliquots of a 1:1 (w/w) mixture of wheat bran and orange bagasse were placed in 250 mL Erlenmeyer flasks, sterilized at 120°C for 40 min. Afterwards the material was hydrated with 0.1% (NH₄)₂SO₄ and 0.1% MgSO₄·7H₂O sterile solution, to 80% moisture. This substrate was inoculated with conidia suspension and cultured at 28°C for 14 days. Every two days, one flask and one pack were removed and the fermented material in each was mixed with 8mL distilled water per gram of substrate, stirred for 30 min, filtered and centrifuged at 10,000 *g* for 15min. at 2°C. The supernatant was used as crude enzyme solution.

2.3. 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 for 10 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].

2.4. Enzyme activity measurements:

Exo-polygalacturonase (exo-PG) activity was assayed in a mixture containing 1% pectin citrus solution (92% esterified – Sigma) in 0.2M sodium acetate buffer (pH 5.5) at 50°C for 10 min. The number of reducing groups, expressed as 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 μ mol of galacturonic acid respectively per minute.

Endo-polygalacturonase (endo-PG) was measured viscosimetrically by adding 2mL of crude enzyme to 6mL of citrate-NaOH buffer 0.2M (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.

2.5. Enzyme purification procedure

The crude enzyme solution obtained after 336 h fermentation was concentrated by ultrafiltration with Quixstand™ Benchtop of GE Healthcare at 10 kDa cut-off and loaded on Sephadex G50 (Pharmacia) column (2.6 x 90 cm).

The crude extract was also submitted to preliminary treatment with Caulin™, (aluminum silicate) for removal of the pigments and others proteins (40 to 60 mg of Caulin™ for milliliter of solution). After 10 minutes of incubation, the enzymatic solution was centrifuged to 10.000 *g* / 20 min at 2°C.

The enzymatic solution treated with Caulin™ was dialysed against acetate buffer 20 mM pH 5.0 at 4 °C for 24h and concentrated by ultrafiltration with Quixstand™ Benchtop of GE Healthcare at 10 kDa cut-off. The material was, loaded on Sephadex G-50 (Pharmacia) column (2.6 x 90 cm) equilibrated with 40 mM acetate buffer (pH 5.0) and eluted with the same buffer at a flow rate of 18 mL h⁻¹ (0.3 mL min⁻¹). Protein fractions corresponding to the PG activity peak were pooled for the characterization.

2.6. Analytical electrophoresis

The molecular weight of the purified enzyme was determined by SDS-PAGE in a Mini Protean II apparatus (10 x 8 cm) (Biorad). Electrophoresis was carried out on a polyacrylamide composed of 4% (w/v) stacking gel and 10% (w/v) resolving gel in Tris/glycine buffer (pH 8.3) [13]. Molecular weight marker 6.5 - 180 kDa – Sigma (M6539) was used. The protein band was visualized by silver staining.

Analytical isoelectric focusing-PAGE was performed with an Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing system (Amersham) on a 12.5% polyacrylamide gel (14 x 15 cm) containing 5% Pharmalyte (pH 3.0 - 10.0) supplied by GE

Healthcare, in accordance with the instructions of the supplier. The gel was silver-stained for protein determination.

2.7. Protein estimation

Protein concentration was determined in the concentration range of 1 - 10 and 10 – 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ by the microassay method [14], with bovine serum albumin (SAB) as the standard.

2.8. Enzyme characterization

PG optimal activity was assayed as a function of pH, in McIlvaine buffer (pH 4.0 - 8.0), at 55°C with 1% high-esterified apple pectin (Sigma) as substrate. The effect of temperature on PG activity was determined in the McIlvaine buffer, incubated at temperature between 35°C and 70°C, at the pH optimum.

The thermal stability was investigated by measuring the residual activity of the enzyme after 1h of incubation at temperatures between 5°C and 80°C. The “half-life” time was determined by incubating the enzyme at 60°C for 1 h, at the pH and optimal temperature. The PG activity was determined each 5 min.

pH stability of the purified enzyme was evaluated by dispersing (1:1 – v/v) enzyme solution in McIlvaine buffer solutions pH 3.0 - 8.0 and Glycine-NaOH buffer pH 8.0 - 10.5 and maintaining these solutions at 25 °C for 24 h. An aliquot was taken to determine the remaining activity at the optimum pH and temperature.

The Michaelis constant (K_m) and V_{max} values were determined from Lineweaver-Burk plots of enzyme activity measured with citrus pectin as substrate, at concentrations between 1.0 and 10.0 mg mL^{-1} . The results are plotted utilizing the program Grafit 5.0™.

The effect of various metallic ions on enzyme activity was evaluated at a concentration of 2.0, 5.0 and 10.0 mM in the reaction mixture, with (Ag^+ , K^+ , Na^+ , Cr^+ , Cu^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} and EDTA).

The substrate specificity was evaluated using polygalacturonic acid, citrus pectin with 26%, 92% degree of esterification (D.E) and apple pectin (high D.E. - Sigma) as substrates under optimal conditions for enzyme activity.

The product of the hydrolysis of apple pectin (Sigma) by PG were analyzed by paper chromatography on Whatman No. 1 paper, with ethyl acetate / isopropanol / water (6:3:1, by volume) as the mobile phase.

3. Results and Discussion

3.1. Production of PG by SSF

The optimal condition for the production of Exo-PG by *Penicillium viridicatum* RFC3 were determined in previous works using the mixture of wheat bran and orange bagasse (1:1 – w/w) [11]. The PG production started at 144 hours of cultivation and peaked to 336 h (Fig. 1). The profile of PG production in SSF is similar to observed with *Aspergillus niger* and *Thermoascus aurantiacus* cultivated on sugar cane bagasse and orange bagasse [5,6,15].

At the end of the fermentative period, the reducing sugars consumption was 77.7%. The proteins levels ranged from 7.1 mg mL⁻¹ to 24.07 mg mL⁻¹. During fermentation process occurred variations on pH of fermentation media values, which start at 5.0, becoming slightly acid after 48 and 96h (pH 4.6 and 4.8 respectively) and later, a slightly alkalization occurred and pH reached 6.2 at 336 h (Figure 1).

According to Botella et al [41] reducing sugar consumption by *A. awamori* cultivated in grape pomace reached 61% after 125 h of fermentation. At the first phase of growth, the consumption of sugar by the microorganism was associated with the increase of the the Exo-PG. After consumption of free sugars the fungi began to use their hydrolytic enzymes to obtain other assimilated carbon sources. On the other hand the PG production would show a catabolic repression when the reducing sugar concentration in the medium is high. [41].

The medium pH variation could be due to organic acids released during the growth of fungi (acidification of medium). After this period, the pH increases

as the reducing sugars level was very low, suggesting the utilization of organic acids as carbon sources when the sugar is limited [41, 42].

During fermentation period, extracellular enzymes can remain inactivated in intracellular medium, by glycosylated form. These enzymes could be secreted when the conditions of extracellular pH is favourable [16,17,18,19,20,21].

3.2. Purification of PG

The crude enzyme solution, obtained after 336 hours of fermentation, was concentrated by ultrafiltration and loaded on Sephadex G-50 column and 6 peaks of PG were obtained (Fig. 2A). In order to removing the excess of pigments originating from the fermentative process and other proteins, the treatment with caulin (40 mg mL⁻¹) was carried out. With concentrations of 60 mg mL⁻¹ caulin, 92.5% of the total proteins have been removed and only 59.38% of the enzymatic activity were recovered, while with 40 mg mL⁻¹ caulin, 71.25% of the total proteins were removed with lost of only 15.81% of the enzyme activity.

A volume of 450 mL of the enzymatic solution treated with 40 mg mL⁻¹ of caulin was submitted to ultrafiltration in membrane with 10 kDa cut off. A recuperation factor of the enzyme activity was 27.7% with a purification factor of 10 times (Table 2)

The concentrated material was loaded on column Sephadex G-50, resulting in a single peak for Polygalacturonases (PG), which was eluted out before of proteins peak (Fig. 2). The electrophoresis PAGE-SDS revealed a homogeneity of the polygalacturonase between 190 - 220 mL of elution volume (Fig. 3). Those data indicate that the treatment with caulin removed to other five isoforms of PG.

The purified PG revealed a molar mass of 24.12 kDa (Fig. 3). The confirmation of homogeneity of PG was established by the determination of its isoelectric point which gel showed a single band on a pI of 6.5 (data not shown).

The purified PGs from several fungal have been reported to show molar masses which range from 360 amino acids to a 496 kDa [22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29].

The *Penicillium viridicatum* produce initially 3 PG isoforms in medium with wheat bran and orange bagasse [5], but when this medium is moisturized at

80% and the time of fermentation is varied, other isoforms can be produced. This indicates that the microorganisms produce different amounts of pectinases and types every time that a cultivation factor inside the medium is modified.

On the other hand, isoforms produced by a same microorganism which present differentiated molar masses, could demonstrate different glycosylation degrees in these structures, what should indicate to be the same synthesized enzyme. This variation in the molar mass can be due to the involvement of a single gene in the proteic synthesis, instead of several genes [30, 31, 32].

Besides, a great amount of isoforms produced is balanced for specific advantages as action (endo or exo) and different substrate affinity allowing an adaptation of the metabolism in function of the nutrients variation. In other cases the presence of a less sensitive isoform to stress factors can be seen as a positive factor for the repaired of the normal metabolism when the nutritional conditions are favorable [5, 6, 30, 32, 33].

The purification of polygalacturonases is summarized on Table 2. Three stages were necessary for the polygalacturonases purification which yielded 6.5% of the enzyme.

3.3. Biochemical properties of the purified polygalacturonase.

PG was tested on pectin with several esterification degrees (26 to 92%) and from two different origins (apple and citrus). The enzyme presented higher activity on citrus pectins with high esterification degree, and on apple pectin (4.5 U mL⁻¹). Those data indicate that purified PG has polymethylgalacturonase (PMG) (Fig. 4).

The action of the PMG on the apple pectin was also evaluated through measure of viscosity of the reaction mixture. The Figure 4B shows that the enzyme presented low capacity of reduction of the viscosity of the pectin solution, suggesting an exo action. The analysis of the products of enzymatic hydrolysis, through paper chromatography, indicated that the action of the enzyme on the apple pectin liberated galacturonic acid (Fig. 5), reinforcing that the purified enzyme is one Exo-Polymethylgalacturonase (Exo-PMG).

The effects of different ions on the activity of Exo-PMG were tested to concentrations of 2, 5 and 10 mM. The ions which promoted a maximum

inhibition at 40 - 50% in the original activity, at 10 mM, were remixed with 2 mM of EDTA. The activity of PMG was increased 96% in the presence of Ba^{2+} , and 8 - 12% in presence of Na^+ . The ion Ca^{2+} didn't influence the activity of the enzyme. Divalent ions as Hg^{2+} , Mn^{2+} and Cu^{2+} strongly inhibit the enzymatic activity in about 70 - 90%. The other ions tested also demonstrated an inhibition in the enzymatic activity, however in smaller degree. The inhibition of the activity of PG in presence of 2 mM EDTA suggests that the enzymatic activity is cation dependent (Tab. 2).

The catalytic activity of PMG was decreased significantly in presence of EDTA and Ba^{2+} , Ag^{2+} and Al^{3+} and was completely inhibited when Na^+ and K^+ was used on reaction mixture.

Three polygalacturonases produced by the *Aspergillus carbonarius* as a commercial enzymatic mixture were purified and characterized. The Ba^{2+} increased the activity of PG just 6%. This ion acted differently on the other two purified PGs (II and III) not affecting PG - II activity and inhibiting the PG - III in 22% [34].

The presence of 10 mM of EDTA lead to an inhibition of activity of purified PG from *Bacillus sp.* [43]. When EDTA is associated to some metallo enzymes makes the activity decreases or disappear. Besides, EDTA linked with metallic ions, can cause instability to tertiary structure of the protein [39].

Exo-PMG presented optimal pH at 6.0 and was stable when in substrate absence, at pH 7 - 10. At pH 4 - 6 and 11 the enzyme decreased 55 - 70% of the original activity. The presence of the ion Ba^{2+} (10mM) increased the enzyme stability which maintained 80 - 100% of the original activity in pH 5 - 11 (Fig. 6).

Exo-PMG presented an optimal activity at 60°C. When in absence of substrate, the enzyme preserved 60 - 75% of the it's original activity at 45°C for 1h while at 60 and 70°C the activity declined to 18 and 8%, respectively. At 80°C occurred the complete denaturation of the protein. In the presence of 10mM of Ba^{2+} 60 - 75% of the activity was maintained at 5 - 55°C. At 60, 70 and 80°C were observed the enzymatic denaturation as well as Exo-PG tested in the absence of Ba^{2+} (Fig. 7).

The Exo-PMG presented optimum pH and temperature similar those produced by *Penicillium frequentans* (5.0 and 50°C), *Saccharomyces cerevisiae*

(5.5 and 50°C), *Aspergillus awamori* (5,0 and 50°C), *Thermoascus aurantiacus* (5.0 - 5.5 and 60-65°C) [23, 24, 25, 26, 27].

The Exo-PMG purified was maintained at 60°C/1h in Ba⁺² presences and absence. When in Ba⁺² absences, it presented a half-life of approximately 7.5 min and when in presence of this ion, the half-life increased to 10 - 12.5 min (Fig. 8).

The influence of metallic ions in pectinases half-life was also reported for putified PGs I and II, from *A. niger*. The presence of the ion K⁺ increased the half-life of these enzymes in about 1 minute [36].

The capacity of barium in increasing the activity and the stability of Exo-PMG has been reported to stabilize the states of transition enzyme-substrate carried electrically. The relation Ba²⁺-thermoestability have been suggesting that changes in flexibility of enzyme structure favouring the binding enzyme-substrate, increasing enzymatic activity and protecting the enzyme against thermal denaturation [44].

The K_m of Exo-PMG was 1.82 mg mL⁻¹ and in Ba²⁺ presence, the enzymatic affinity was 1.40 mg mL⁻¹. In relation to V_{max} the Exo-PMG presented a value of 81 μmol min⁻¹ mg⁻¹ and in presence of Ba²⁺ it was 55.16 μmol min⁻¹ mg⁻¹ (Fig. 9).

The K_m and V_{max} from purified PGs have been reported to show values which range from 0.0016 mg mL⁻¹ to a 4,7 mg mL⁻¹ for K_m and 13.33 μmol min⁻¹ mg⁻¹ to a 2571 μmol min⁻¹ mg⁻¹ from V_{max} [23,24,26,30,33,37, 38].

4. Conclusions

The PG from *Penicillium viridicatum* RFC3 showed to be a Exo-polymethylgalacturonase able to release galacturonic acid as a hidrolisis product. The enzyme showed an interesting answer in the presence of ion Ba²⁺ which increased the enzyme stability when incubated in acid pH and in temperature of 60°C. The presence of this ion also increased the affinity the enzyme by the substrate .

Acknowledgments

The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

5. References

- [1] Whitaker, J.R., Microbial pectinolytic enzymes. ed W.M., Fogarty, C.T., Kelly, Microbial enzymes and biotechnology. 2nd ed. London: Elsevier Science Ltd., 1990, pp. 133–176.
- [2] Ward, O.P., Moo-Young, M., Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharides. CRC Critical Reviews Biotechnology, 1989, 8 237–274.
- [3] Bene, J.A.E., Vincken, J.P., Van Alebeek, G.J.W.M. Microbial pectinases. In: Seymour, G.B., Knox, J.P. (Eds.), Pectins and their Manipulation. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 2002, 174-221.
- [4] Singh, S.A., Ramakrishna, M., Rao, A.G.A., Optimization of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented broth of *Aspergillus carbonarius*. Process Biochemistry, 1999, 35 411–417.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Scerra, V., Caridi, A., Foti, F., Sinatra, M.C., Influence of dairy *Penicillium* spp. on nutrient content of citrus fruit peel. Animal Feed Science and Technology, 1999, 78, 169-176.
- [8] Cabanne, C., Doneche, B., Purification and characterization of two isozymes of polygalacturonase from *Botrytis cinerea*: Effect of calcium ions on polygalacturonase activity. Microbiology Research, 2002, 157, 183-189.
- [9] Nishio, N., Nagai, S., Single cell protein production from mandarin orange peel. European Journal Applied Microbiology and Biotechnology, 1981, 11, 156-160.
- [10] Saito, K., Takakuwa, N., Oda, Y., Purification of the extracellular pectinolytic enzyme from the fungus *Rhizopus oryzae* NBRC 4707. Microbiological Research, 2004, 159, 83-86.
- [11] Silva, D., Tokuioshi, K., Martins, E.S., Da Silva, R., Gomes, E. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. Process Biochemistry, 2005, 40, 2885-2889.
- [12] Miller, G. L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry, 1959, 31, 426-428.
- [13] Laemmli, U., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227, 680-685.
- [14] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976, 72, 248-254.

- [15] 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. *Applied Microbiology Biotechnology*, 1995, 43, 808-814.
- [16] 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 of Microbiology*, 1991, 37, 912-917.
- [17] Maldonado, M. C., Strasser De Saad, A. M. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1998, 20, 34-38,
- [18] Yakoby, N., Kobiler, I., Dinoor, A., Prusky, D. pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. *Applied Environmental Microbiology*, 2000, 66, 1026-1030.
- [19] Olsson, L., Christensen, T. M. I. E., Hansen, K. P., Palmqvist, E. A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbiology Technology*, 2003, 33, 612-619.
- [20] Cotton, P., Kasza, Z., Bruel, C., Rascle, C., Fevre, M. Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 227, 163-169.
- [21] Vautard-Mey, G., Fevre, M. Carbon and pH Modulate the Expression of the Fungal Glucose Repressor Encoding Genes. *Current Microbiology*, 2003, 46, 146-150.
- [22] Lang, C., Dörnenburg, H., Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2000, 53, 366-375.
- [23] Jayani, R. S., Saxena, S., Gupta, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 2005, 40, 2931-2944.
- [24] Barnby F.M., Morpeth F.F., Pyle D.L., Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification and partial characterization of the enzyme. *Enzyme Microbiology Technology*, 1990, 12, 891-897.
- [25] Singh, K., Puniya, K., Singh, S. Biotransformation of crop residues into animal feed by solid state fermentation. *Journal Science Industrial Research*, 1999, 55, 472-478.
- [26] Koboyashi T, Higaki N, Yajima N, Suzumatsu A, Haghihara H, Kawai S, . Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 2001, 65, 842-847.
- [27] Pietro A.D., Roncero M.I.G. Purification and characterization of an exopolygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters*, 1996, 145, 295-298.
- [28] Coelho, M. A. Z., Medronho, R. A, Leite, S. G. F., Couri, S. Partial purification of polygalacturonase produced by solid state cultures of *Aspergillus niger* 3T5B. *Reviews Microbiology*, 1995, 26, 318-322.

- [29] Niture, S. K., Pant, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. *Microbiology Research*, 2004, 154, 305-314.
- [30] Fonseca, M. J. V., Said, S. Sequential production of pectinases by *Penicillium frequentans*. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 1995, 11, 174-177.
- [31] Serrat, M., Bermudez, R. C., Villa, T. G., Production, purification and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 2002, 97, 193-208.
- [32] Naessens, M., Vandamme, E.J. Multiple forms of microbial enzymes. *Biotechnology Letters*, 2003, 25, 1119-1124.
- [33] Chellegatti, M. A. S. C., Fonseca, M. J. V., Said, S. Purification and partial characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium frequentans*. *Microbiology Research*, 2002, 157, 19-24.
- [34] Devi, N. A., Rao, A. G. A. Fractionation, purification, and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. *Enzyme Microbiology Technology*, 1996, 18, 59-65.
- [35] Mitchell, D. A., Berovic, M., Krieger, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances Biochemistry Engineering Biotechnology*, 2000, 68, 61-138.
- [36] Naidu, G. S. N., Panda, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 16, 57-67.
- [37] Barense, R.I., Chellegatti, M.A.S.C., Fonseca, M.J.V., Said, S. Partial purification and characterization of exopolygalacturonase II and III of *Penicillium frequentans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2001, 32, 327-330.
- [38] Singh, S. A., Rao, A. G. A. A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 2002, 35, 115-123.
- [39] Losonczi, A., Csiszár, E., Szakács, G., Bezúr, L. Role of the EDTA Chelating Agent in Bioscouring of Cotton. *Textile Resource Journal*. 2005, 75, 5, 411-417.
- [40] Nighojkar, S., Phanse, Y., Sinha, D., Nighojkar, A., Kumar, A. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. *Process Biochemistry*. 2006, 41, 1136-1140.
- [41] Botella, C., de Ory, I., Cantero, D., Blandino, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*. 2005, 26, 100-106.
- [42] Akimitsu, K., Isshiki, A., Ohtani, K., Yamamoto, H., Eshel, D., Prusky, D. Sugars and pH: A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. *Physiological and Molecular Pathology*. 2005 (in press)

[43] Horikoshi, K. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. *Agricultural Biological Chemistry*.1972, 36, 285-293.

[44] Hernandez, M. S., Rodriguez, M.R., Guerra, N.P., Roses, R.P. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal Food Engineering*, 2006,73, 93-100.

**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

Table 1

Summary of treatment of crude enzyme with caulin.

Caulin (mg mL⁻¹)	PG (U mL⁻¹)	Protein (mg mL⁻¹)	S. A. (U mg⁻¹)	Purification Factor	Yield (%)	Abs 382nm
Control	10.81	0.240	45.04	-	100	0.907
40	9.1	0.069	131.88	2.92	84	0.451
50	7.76	0.083	93.94	2.08	71	0.338
60	6.42	0.018	356.66	7.91	59	0.256

*PG (Polygalacturonase); S. A. (Specific Activity – U PG / mg protein);

Table 2

Summary of purification of *Penicillium viridicatum* RFC3 polygalacturonase by solid state fermentation of wheat bran and orange bagasse.

Step	Volume (mL)	PG (U mL⁻¹)	Protein (mg mL⁻¹)	U_{total} (U x mL)	S.A. (U mg⁻¹)	Yield (%)	Fold purification
Crude enzyme	450	10.81	0.240	4864.5	45.04	100	-
Caulin	450	9.1	0.069	4095	131.88	84.2	2.93
Ultrafiltration – 10KDa	45	29.98	0.028	1349.1	1070.71	27.7	23.77
Sephadex G- 50	40	29.98	0.028	1199.2	1070.71	24.65	23.77
Fração I	75	4.2	0.003	315	1400	6.5	31.08

* S. A. (Specific Activity – U / mg protein);

Table 3
Effect of some metal ions and EDTA on the PMG activity .

	Ion concentration			
	2mM	5mM	10mM	10mM + 2mM EDTA
Control	100	100	100	100
Ba ⁺²	96	99.9	196.7	121.4
Ca ⁺²	91.8	99.4	97.4	83
NaCl	90.1	111.8	108.81	0.0
Ag ⁺²	72.8	54.1	69.98	56.0
Al ⁺³	79.1	81.4	44.3	25.3
Cr ⁺³	47.4	31.9	N dtm	N dtm
Zn ⁺³	77.4	65.9	63.8	N dtm
Hg ⁺²	7.5	9.8	N dtm	N dtm
Fe ⁺³	66.4	38.6	N dtm	N dtm
Mn ⁺²	18.5	6.7	N dtm	N dtm
Mg ⁺²	49.7	71.6	77.04	76.2
Cu ⁺²	28.9	21	N dtm	N dtm
Co ⁺²	39.9	48.4	46.2	N dtm
K ⁺¹	72.2	78.3	60.2	0.0
Ni ⁺²	44	46.4	51.75	N dtm
EDTA	57.8	60	90.4	--

N dtm – effect on activity not determined

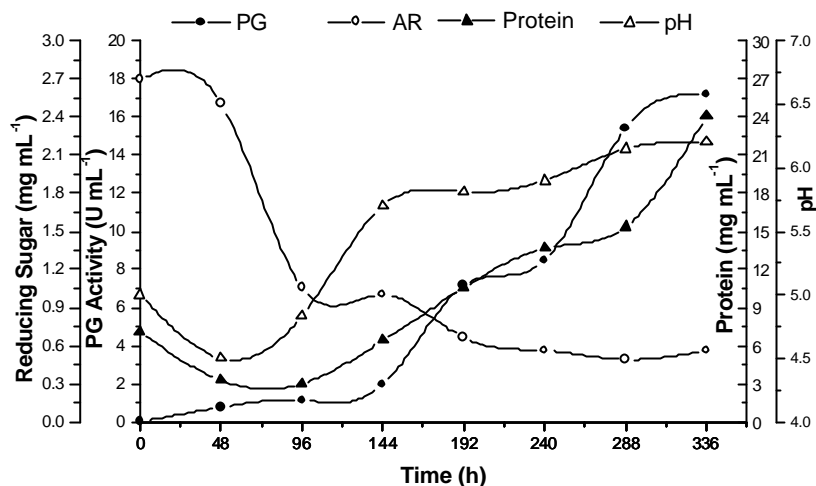


Fig. 1: Production of Exo-PG by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid state fermentation with wheat bran and orange bagasse (1:1 – w/w).

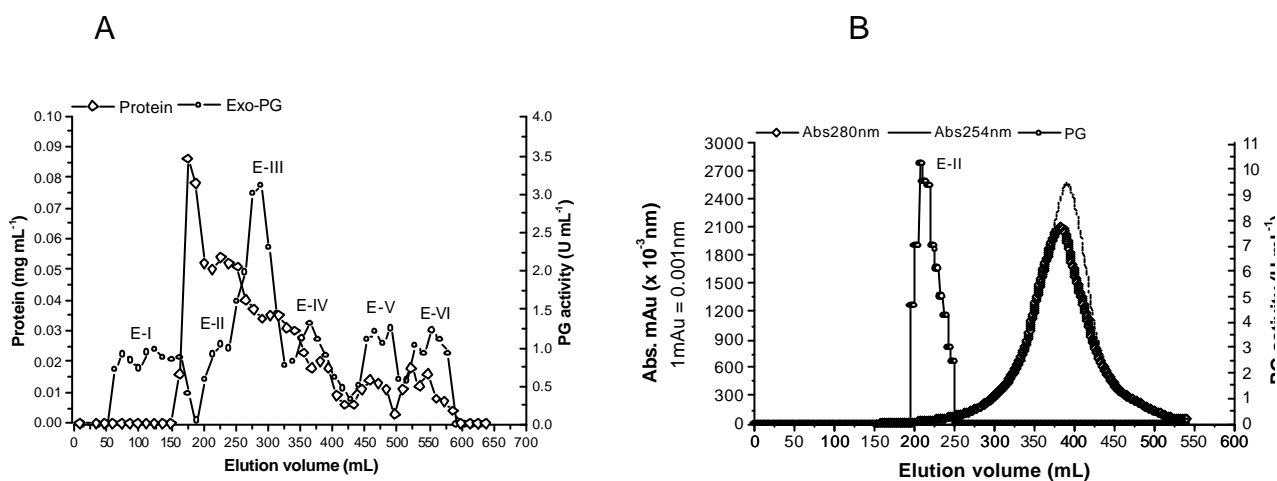


Fig. 2: Gel filtration chromatography of PG on Sephadex G-50 (2.5 x 80 cm) equilibrated with 40 mmol L⁻¹ acetate buffer, pH 5.0. (A) crude extract concentrated with ultrafiltration 10 kDa cut-off, (B) crude extract treated with caulin (40 mg mL⁻¹)

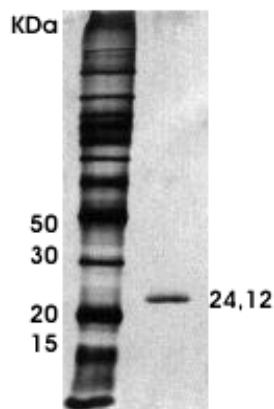


Fig.3: SDS-PAGE of purified PG from Gel filtration chromatography on Sephadex G-50

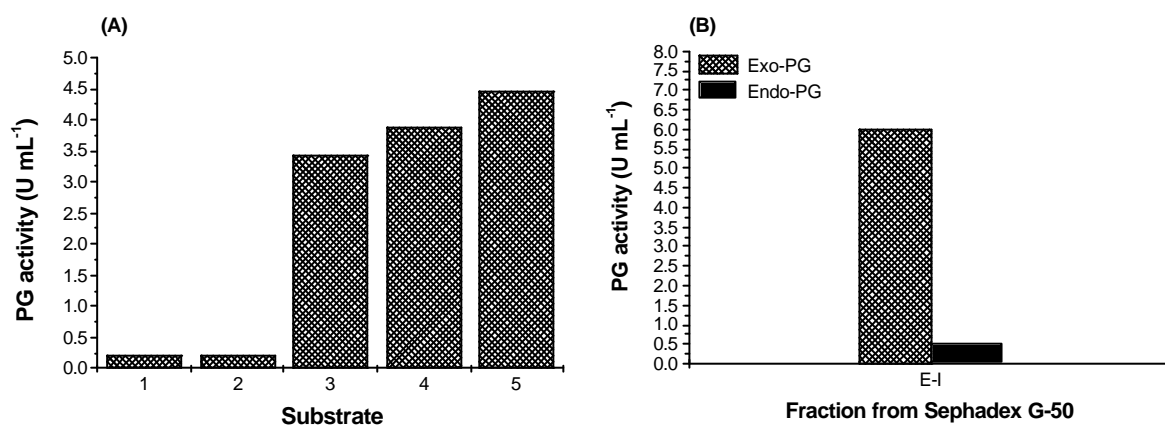


Fig. 4: PG Characteristics: (A) Substrate specificity: 1. Poligalacturonic acid; 2. citrus pectin (26% esterified); 3. commercial citrus pectin (87% esterified); 4. citrus pectin (92% esterified); 5. apple pectin (high esterified); (B) Mode of action of PG (endo and exo activity).



Fig. 5: Hydrolyse products of Exo-PG. 3G (trigalacturonic acid), 2G (digalacturonic acid), 1G (galacturonic acid), H (enzymatic hydrolysed).

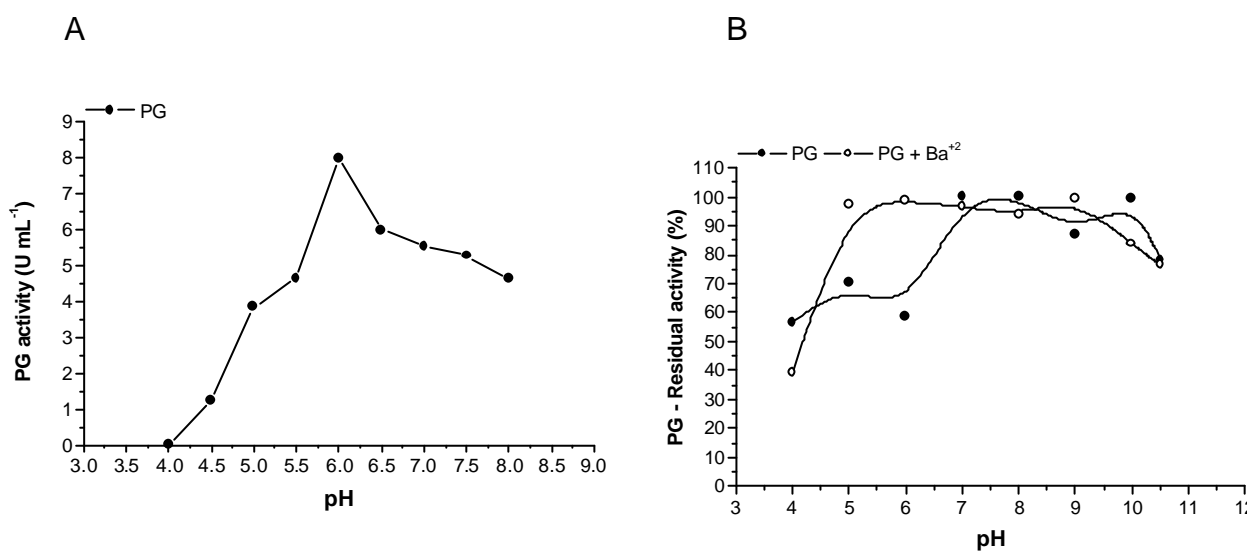


Fig. 6: (A) Effect of pH on Exo-PMG activity; (B) Effect of pH on Exo-PG stability.

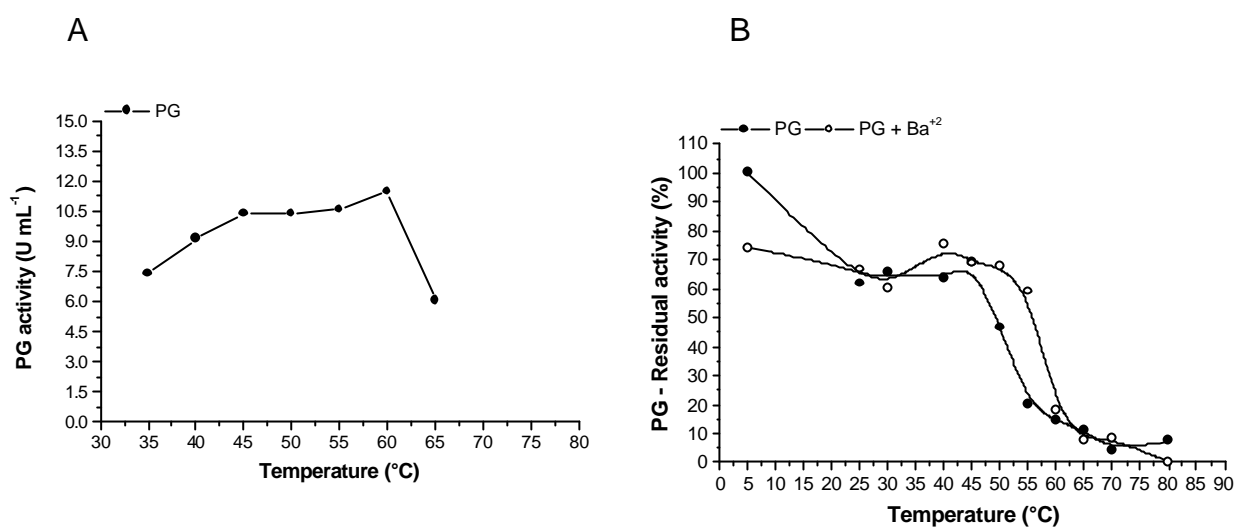


Fig. 7: (A) Effect of Temperature on activity of Exo-PMG; (B) Effect of temperature on the stability of Exo-PG.

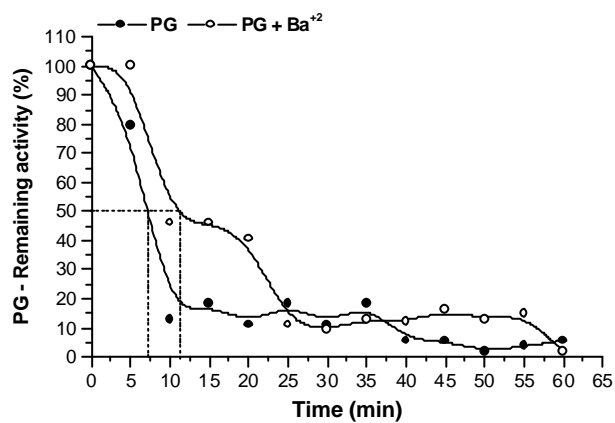


Fig. 8: Half-life time of Exo-PMG (60°C / 1 h).

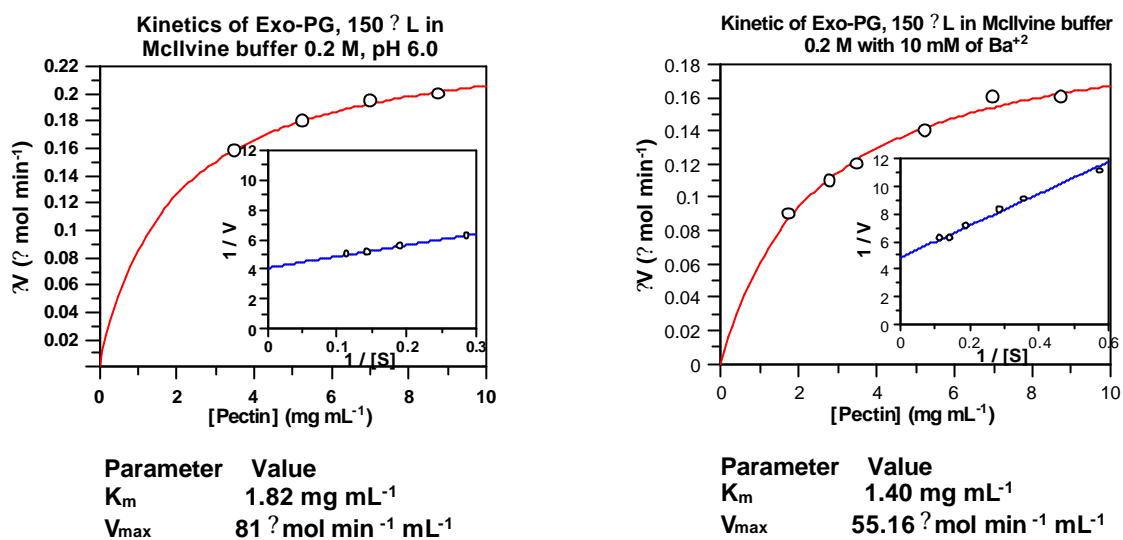


Fig 9: Kinetics parameters of purified Exo-PMG in apple pectin (high esterified) (A), with Ba²⁺ (B).

V. CAPITULO III

Produção de poligalacturonase por *Penicillium viridicatum* RFC3 em fermentação submersa

***Dênis Silva^{1*}, Eduardo da Silva Martins¹, Rodrigo Simões Ribeiro Leite¹,
Roberto da Silva¹ and Eleni Gomes¹***

¹ Unesp (State University of São Paulo) – IB (Biology Institute)- Rio Claro, São Paulo, Brasil

* Corresponding author: Eleni Gomes, Unesp- IBILCE, Biology Department, Rua Cristovao Colombo, 2265, Jd. Nazareth, São José do Rio Preto, S.P., Brazil, cep 15054-000, phone nº +55 17 32212393, fax +55 17 32212390e-mail: eleni@ibilce.unesp.br

Resumo

O cultivo do *P. viridicatum* em FSM utilizando 3% de extrato dos resíduos de farelo de trigo, bagaço de laranja e uma mistura de farelo de trigo e bagaço de laranja (1:1 - p/p). Os meios foram liquefeitos e filtrados e o extrato proveniente, foi utilizado como meio de fermentação. Foi usada também a pectina de citrus a 1%, como fonte de carbono. Além destes foi utilizada a água amarela (resíduo do processamento da indústria cítrica) no seu estado bruto e com diluições (2, 4 e 10x). Foram testadas variações no pH inicial dos meios (4,5, 5 e 5,5) e a influência do tempo de fermentação (24-96h) na produção da enzima. Os dados foram submetidos à análise de variância, seguindo delineamentos fatoriais que revelaram que o extrato do bagaço de laranja com pH inicial de 5,5 foi o melhor meio para a produção da Exo-PG em FSM,

obtendo 1,5 U/mL em 96 h de cultivo. A segunda melhor produção foi obtida em água amarela não diluída com pH inicial de 5,5 e em 96h de cultivo (1,08 U/mL).

Palavras chave: *Penicillium*, resíduos agro-industriais, fermentação submersa

1. Introdução

As pectinases constituem uma grande família de enzimas compostas por pectina hidrolases, liases e esterases que atuam na degradação das substâncias pécticas presentes no material vegetal (HADJI-TAIEB et al., 2006; FOGARTY e WARD, 1972; ROMBOUTS e PILNIK, 1980). Essas enzimas possuem um importante papel biotecnológico atuando no aumento do rendimento na extração de sucos e diminuindo a viscosidade dos mesmos, além de atuar em conjunto com outras enzimas na extração de óleos, carotenóides e melhorando o processamento e a qualidade de vinhos (SIN et al., 2006; BUSTO et al., 2005; HADJ-TAIEB et al., 2006; ÇINAR 2005)

A fermentação submersa (FSM) é um sistema empregado industrialmente para a produção de uma grande variedade de metabólitos de origem fúngica de grande importância socio-econômica e que chegam a movimentar bilhões de dólares por ano (GIBBS et al., 2000). O processo de fermentação submersa, utilizando fungos filamentosos, é afetado por diversos fatores como fontes de carbono e nutrientes minerais, pH, temperatura os quais interferem no crescimento e na produção de metabólitos (BOTELLA et al., 2005; AKIMITSU et al., 2005; PATIL e DAYANAND 2005).

Resíduos líquidos derivados do processamento industrial como água amarela e outros resíduos da agroindústria (ESPACHS-BARROSO et al., 2004; TAVARES et al., 1998; SILVA et al., 2002) têm sido utilizados como fonte de nutrientes em processos fermentativos devido a sua complexidade e pouca necessidade de suplementação (HOLST, 1997; ALAZARD e RAIMBAULT, 1981; SILVA, 2003). Este trabalho teve por objetivos avaliar fontes de carbono alternativas e estudar os efeitos das condições de cultivo na produção de Poligalacturonase (PG), pelo fungo *Penicillium viridicatum* RFC3, em Fermentação Submersa (FSM).

2. Material e Método

2.1. Microrganismo.

O fungo *Penicillium viridicatum* RFC3 foi isolado a partir de amostras de hortaliça em decomposição e selecionado em trabalhos anteriores como bom produtor de pectinases assim como, xilanase, celulase e amilase (SILVA et al., 2005). O fungo foi identificado pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, Campinas –SP.

2.2. Meios de cultivo.

2.2.1. Meio de manutenção.

O fungo foi mantido em meio Sabouraud acrescido de 0,3% de pectina, a 7°C em geladeira, sob óleo mineral e em tubos criogênicos a –20°C, em meio contendo glicerol.

2.2.2. 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 tomados volumes de suspensão de modo a se obter um inóculo de 10^7 esporos por mililitro de meio de cultivo.

2.3. Obtenção da enzima por fermentação submersa

Foram testados, para a fermentação submersa, os seguintes meios:

? “Água amarela”, resíduo líquido obtido do processamento de suco de laranja fornecido pela Citrovita S/A, Catanduva-SP. Esse material foi usado na forma bruta e diluída com água 2, 4 e 10 vezes.

? Meio líquido semi-sintético (M1) composto por 1% de pectina de citrus 67% esterificação (Kelco-Limeira), 1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3% de KH_2PO_4 , 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,05% de CaCl_2 (RHA et al., 2001).

? Extratos de resíduos sólidos agroindustriais como o farelo de trigo, bagaço de laranja e mistura de ambos preparados como descrito a seguir.

Os resíduos sólidos foram misturados com água na proporção de 3% e a suspensão misturada em liquidificador. A porção sólida foi separada por filtração e o filtrado utilizado como meio de cultivo.

Os valores dos pHs iniciais dos meios foram corrigidos para 4,5, 5,0 e 5,5, com soluções de NaOH 0,5 M ou HCl 0,5 M.

A fermentação submersa foi realizada em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 20 mL de meio. O crescimento ocorreu a 28°C, sob agitação de 100 rpm, por 24 a 96 horas. O material fermentado foi filtrado a vácuo, utilizando papel Whatman nº 1 e o meio de cultivo, livre do micélio, foi utilizado como solução enzimática bruta.

2.4. Determinação do crescimento microbiano

O crescimento microbiano foi determinado pela quantificação da biomassa celular seca produzida ao longo do período fermentativo. A massa micelial separada por filtração foi lavada com água e seca em estufa a 65°C até peso constante.

2.5. Medida da atividade de poligalacturonase (PG)

A atividade da poligalacturonase foi avaliada numa mistura contendo 0,8 mL de tampão acetato 0,2 M, pH 5,0, contendo 1% de pectina (Kelco-Limeira) com 64-72% de esterificação e 0,2 mL de solução enzimática bruta. O açúcar redutor liberado (ácido D-galacturônico), após a incubação da mistura de reação a 45°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 μ mol de ácido galacturônico por minuto, nas condições de reação.

2.6. Determinação de proteínas totais

A determinação dos teores de proteínas totais da solução enzimática bruta foi feita através do método de BRADFORD (1976), usando soro albumina bovina como padrão.

2.7. Análise estatística dos dados

A análise de variância dos dados obtidos para a produção de Exo-PG em FSM foi feita considerando os fatores “meio de cultivo” para a fermentação líquida, “pH inicial” do meio de cultivo e o “tempo de fermentação”, os quais foram analisados através de um delineamento fatorial. A quantidade de dados gerados foi muito grande excedendo a capacidade do programa utilizado não permitindo sua análise conjunta. Os ensaios foram agrupados em: 4x3x4 (MEIOS DE CULTIVO X pH X TEMPO), 4x3x4 (ÁGUA AMARELA COM VÁRIAS DILUIÇÕES X pH X TEMPO) e 2x3x4 (MELHOR MEIO DE CULTIVO E MELHOR ÁGUA AMARELA X pH X TEMPO) (Tab. 1). Os desdobramentos das médias das atividades das enzimas foram feitos através do teste de Tukey, tendo como significância os valores maiores que a diferença mínima significativa (?) sendo calculados pela seguinte fórmula:

$$? ? q \frac{\sqrt{QMR}}{\sqrt{r}}, \text{ onde o valor de } q \text{ é obtido a partir de uma tabela de}$$

“range studentizado”, QMR é o quadrado médio dos resíduos e r é o número de repetições dos experimentos (3 repetições).

Os dados foram analisados utilizando-se o programa **Estat** (de livre distribuição), desenvolvido pelos Drs. Sergio do Nascimento Kronka e David Arioaldo Banzatto, na Unesp de Jaboticabal.

Tabela 1: Parâmetros avaliados para a análise de variância da produção de Exo-PG pelo *P. viridicatum* RFC3 em FSM.

Ensaio	Meios para FSM	pH	Tempo(h)
1	Farelo Trigo	4,5, 5,0 e 5,5	24, 48, 72 e 96
	Bagaço de Laranja	4,5, 5,0 e 5,5	24, 48, 72 e 96
	Farelo Trigo/Bagaço	4,5, 5,0 e 5,5	24, 48, 72 e 96
	Laranja	4,5, 5,0 e 5,5	24, 48, 72 e 96
	Meio M1	4,5, 5,0 e 5,5	24, 48, 72 e 96
2	Água Amarela bruta	4,5, 5,0 e 5,5	24, 48, 72 e 96
	Diluída 2x	4,5, 5,0 e 5,5	24, 48, 72 e 96
	Diluída 4x	4,5, 5,0 e 5,5	24, 48, 72 e 96
	Diluída 10x	4,5, 5,0 e 5,5	24, 48, 72 e 96
Blocos	Melhor meio do ensaio 1	4,5, 5,0 e 5,5	24, 48, 72 e 96
	Melhor meio do ensaio 2	x	x
3 (1x2)		4,5, 5,0 e 5,5	24, 48, 72 e 96

3. Resultados

3.1. Produção de Exo-PG em FSM

3.1.1. Resíduos agroindustriais e pectina como fontes de carbono

Inicialmente, foi estudada a produção de Exo-poligalacturonase (Exo-PG) por *P. viridicatum* RFC3, em fermentação submersa (FSM) utilizando resíduos agrícolas e um meio contendo pectina como fonte de carbono. Os resultados são apresentados graficamente, para se analisar o perfil de produção da enzima ao longo do processo fermentativo e analisados estatisticamente, para comparação das quantidades de enzima produzidas (Tabela 1).

Meios contendo o extrato de farelo de trigo proporcionaram a maior produção média de Exo-PG em 24 horas de cultivo, em todos os pHs iniciais. Em meios com pH 5,0 e 4,5 os picos de atividade enzimática (1,3 e 0,96 U/mL), em 24 h, (Fig. 1A), coincidiram com a fase log de crescimento (Fig. 1D). A maior produção da enzima foi observada em pH 5,0, em 24 h de fermentação.

Os níveis de proteínas permaneceram praticamente constantes (± 20 $\mu\text{g/mL}$) durante toda fermentação nos pHs iniciais 4,5 e 5,0, porém em pH 5,5 nota-se uma redução nesses teores em 48 h, e um aumento em 72 h (Fig. 1C).

Os níveis de açúcares redutores foram reduzidos a menos de 0,5 mg/mL após 48 h de fermentação (Fig. 1B). Em todos os valores de pH inicial houve acentuada redução dos pH dos meios em 48 h, ocorrendo, após esse período acentuado aumento do pH (7,0) em todos os meios (Fig.1E).

Nas fermentações contendo bagaço de laranja como fonte de carbono, observou-se que a maior atividade enzimática foi obtida em meio com pH inicial de 5,5, em 48 h de fermentação. Observou-se pela figura 2A, 2 picos de produção média da Exo-PG, em todos os pHs testados. Nos pHs 5,0 e 5,5 o primeiro pico ocorreu com 48 h de cultivo (0,6 e 1,5 U/mL, respectivamente) enquanto que em pH 4,5, este foi observado em 24 h (0,4 U/mL). Em todos os valores de pH um segundo pico foi observado em 96 h.

Assim como no meio com farelo de trigo, os açúcares redutores foram quase totalmente consumidos até 48h de cultivo atingindo concentrações inferiores a 0,2 mg/mL (Fig. 2B). Quanto aos níveis de proteínas no meio, observou-se uma redução de 37,5% dos teores iniciais em todos os pHs, nos períodos entre 24 a 48 h. Após este período, os níveis proteicos permaneceram praticamente constantes entre 11 e 13 $\mu\text{g/mL}$ até 96 h (Fig. 2C). As quantidades de biomassa produzida foram inferiores a 2,5 mg/mL durante toda a fermentação e a fase log de crescimento foi até 48 h (Fig. 2D).

O comportamento do pH nos meios variou da mesma maneira que o observado em farelo de trigo, ou seja, nas primeiras 24 horas houve uma acidificação do meio seguida do aumento do pH até a neutralização em 96 h (Fig. 2E).

Subseqüentemente foi utilizada uma mistura do extrato de farelo de trigo e bagaço de laranja (1,5% cada). A produção média de Exo-PG em todos os pHs iniciais foi inferior a 0,30 U/mL. O meio com pH inicial de 5,5 mostrou pico de produção em 96 h de cultivo (0,3 U/mL)(Fig. 3A). No meio com pH inicial 5,0 foram observados 2 picos de atividade da enzima a 48 e 96 h (0,2 e 0,25 U/mL, respectivamente) enquanto que no meio com pH inicial de 5,0 o pico de produção ocorreu em 72 h (0,2 U/mL).

A biomassa produzida foi, em média, de 2,4 mg/mL no final da fase log (48h) (Fig. 3D).

Os níveis de proteínas foram reduzidos em 48,86% dos teores iniciais entre 24 e 48 horas de cultivo em todos os meios, os quais permanecem constantes entre 12 µg/mL entre 72 e 96 h (Fig. 3C). Assim como nos outros meios testados anteriormente, os açúcares redutores são quase que totalmente consumidos nas primeiras 48 h de fermentação, atingindo valores inferiores a 0,2 mg/mL (Fig. 3B).

O comportamento do pH nos meios testados variou muito em relação ao inicial. Para os meios cujo pH iniciou em 4,5 e 5,0 notou-se uma acidificação nas primeiras 24 h de cultivo, seguida do aumento do pH até cerca de 6,0 - 6,5 em 96 h. No meio com pH inicial de 5,5, também foi observada uma acidificação em 24 h de cultivo, porém o aumento do pH foi menos intenso, permanecendo entre 4,3 e 4,8 até o final da fermentação (Fig. 3E).

Na fermentação em meio semi-sintético, na qual a pectina foi utilizada como fonte de carbono, notou-se um pico de produção da Exo-PG, em todos os pHs testados, a 24 h de fermentação, com 1,0, 0,3 e 1,5 U/mL, respectivamente para os pHs 4,5, 5 e 5,5 (Fig. 4A).

Assim como nos outros substratos testados, os açúcares redutores foram quase que totalmente consumidos, em todos os meios, até 48 h de cultivo, chegando a concentrações inferiores a 0,08 mg/mL (Fig. 4B).

Quanto aos níveis de proteína dos meios, observou-se uma oscilação entre 10 a 15 µg/mL, em todos os pHs iniciais testados. Entre 24 e 48 h de cultivo observou-se uma diminuição nos teores de proteína para até 10 µg/mL, enquanto que entre 48 e 72 h esses teores proteicos aumentam para cerca de 15 µg/mL, voltando a ser reduzidos a 10 µg/mL após esse período (Fig. 4C). Na figura 4D observa-se que os teores de biomassa produzidos foram inferiores a 1,25 mg/mL, durante toda a fermentação e a fase log de crescimento variou entre 48 h para o meio com pH inicial de 5,0, e até 72 h para os demais pHs. O comportamento do pH nos meios foi diferente dos demais meios testados. O pH de todos os meios foi acidificado nas primeiras 24 h. Porém, após esse período, não há uma alcalinização como nos demais resíduos testados e os valores de pH, para todos os meios e permaneceram entre 3,8 e 4,5 até 96 h (Fig. 4E).

Nessa primeira etapa dos experimentos, foram feitas as análises fatoriais 4x3x3 (Meios de cultivo X pH X Tempo de cultivo) para a produção da Exo-PG conforme descrito na Tabela 1, ensaio1, de material e métodos (item 9). Os valores utilizados consistiram de unidade de enzima por mililitro de solução enzimática obtida, pela filtragem do material a vácuo.

Observou-se que, separadamente, os meios de cultivo afetaram a produção da enzima a 1% de probabilidade, segundo o teste F, enquanto que o pH inicial e tempo de cultivo não apresentaram diferenças significativas a 5% de probabilidade. Quando esses fatores interagem entre si, a análise estatística mostrou que a interação dos meios com o tempo de cultivo foi capaz de produzir uma diferença significativa a 5% de probabilidade, na produção da enzima, segundo o teste F. A média geral do ensaio foi de 0,43 U/mL, o desvio foi de 0,56 U/mL e o coeficiente de variação foi de 130,49% (Tab. 2).

Foi aplicado o teste de Tukey para os fatores “meio de cultivo” utilizado “pH” e “tempo de cultivo”. O teste revelou que o bagaço de laranja batido proporcionou uma maior produção da enzima em relação aos demais resíduos, com uma média de 0,698 U/mL (Tab. 3).

Para os fatores pH e tempo de cultivo também foi aplicado o teste de Tukey. Embora não sendo estatisticamente diferentes entre si, o teste mostrou que a atividade da Exo-PG foi maior em meio com pH 5,5 e o melhor tempo de cultivo foi de 96 horas de fermentação (Tab. 3).

3.1.2. FSM em Água Amarela

Nos ensaios de fermentação submersa foi utilizado também o resíduo líquido da indústria do processamento de suco de laranja, conhecido como água amarela. Devido à alta quantidade de proteínas, óleos essenciais, pectinas, açúcares, ácidos orgânicos e sais, esse material é considerado um bom meio de cultivo, tendo sido usado em outros experimentos para crescimento de fungos (TAVARES et al., 1998). A presença de pectina e derivados hidrolisados poderia ser fator de indução e/ou repressão da produção de Exo-PG. Foram testadas diluições de 2, 4 e 10x, além do material bruto. Os pHs iniciais dos meios foram corrigidos para 4,5, 5,0 e 5,5 e as fermentações desenvolvidas por 96h, com tomadas de amostras a cada 24 h.

Inicialmente, a água amarela foi testada na forma bruta. A máxima produção média da Exo-PG (1,08 U/mL) ocorreu em pH 5,0, em 96 h de fermentação (Fig. 5A). Nota-se um aumento gradual da atividade da enzima durante o cultivo o qual coincidiu com o consumo dos açúcares redutores que, após 96h de fermentação, apresentaram concentrações de cerca de 1 mg/mL nos meios com pH inicial de 5,0 e 5,5, porém, foram quase totalmente consumidos no meio com pH inicial de 4,5 (Fig. 5B).

Os níveis de proteína nos meios tiveram variações ao longo de toda a fermentação, iniciando em cerca de 16 a 17 µg/mL e variando para 20 µg/mL em 72 h e cerca de 10 a 13 µg/mL em 96 h (Fig. 5C).

O crescimento microbiano foi alto em todos os meios chegando a 5,8 mg de biomassa/mL ao final da fase log (em 72 h) em meio com pH 4,5, e 4,0 e 4,2 mg de biomassa/mL em meios com pHs 5,5 e 5,0, respectivamente (Fig. 5D).

O pH dos meios variou pouco nesses experimentos, exceto no meio com pH inicial de 4,5 que, em 72 h, atingiu pH de 6,5 e em 96 h, caiu para cerca de 4,8 (Fig. 5E).

Em água amarela diluída 2 vezes, a máxima produção média da Exo-PG foi muito inferior quando comparado a esse resíduo não diluído. Observa-se um aumento gradual na atividade de PG até 96 h, em meios com pHs 5,0 e 5,5 sendo a máxima produção obtida em pH 5,5, em 96 h (0,99 U/mL) (Fig. 6A). Assim como no meio sem diluição, o aumento gradual da produção coincidiu com o consumo dos açúcares redutores que, após 72 h de fermentação, atingiram uma concentração de cerca de 1 mg/mL nos meios com pH inicial de 4,5 e 5,0, porém foram quase totalmente consumidos no meio com pH inicial de 4,5 em 48 h (Fig. 6B).

Os níveis de proteínas nos meios variaram ao longo da fermentação, iniciando com cerca de 13 µg/mL e caindo para 10 µg/mL, em 48 h, e novamente aumentando para 17,5 µg/mL, em 72 h (Fig. 6C).

O crescimento microbiano foi 50% menor, em relação aos meios sem diluição chegando a 2,0 mg de biomassa / mL ao final da fase log, que foi 24 h mais curta (em 48 h) para todos os pHs (Fig. 6D). O pH novamente variou pouco neste cultivo, exceto em 96 h, quando observou-se um aumento do pH de todos os meios em relação ao inicial (Fig. 6E).

Quando a água amarela foi diluída 4 vezes a máxima produção média de Exo-PG foi de 0,5 U/mL, em meio com pH 4,5, em 72 h. Em meio com pH 5,0, obteve-se 0,36 U/mL em 72 h e 0,36 U/mL, a 96 h, no meio cujo pH foi 5,5 (Fig. 7A). O consumo dos açúcares redutores, após 48 h de fermentação, indicou que de cerca de 85% dos açúcares foram consumidos em todos os meios e, após 72 h, estes foram quase totalmente exauridos (Fig. 7B).

Os níveis de proteína novamente mostram os mesmos padrões observados anteriormente, ou seja, caem para cerca de 12 µg/mL em 48, sobem para até 20 µg/mL em 72 h e novamente diminuem para cerca de 12 µg/mL em 96 h (Fig. 7C).

O crescimento microbiano foi praticamente o mesmo em relação ao meio diluído 2x, chegando a 1,50 mg de biomassa/mL ao final da fase log, (72 h) para todos os pHs (Fig. 7D). O pH variou muito neste experimento. Em 24 h, o meio com pH inicial de 4,5 foi acidificado chegando a 3,7 e em 48 h, os pHs 5,0 e 5,5 baixaram para cerca de 4,5. Porém, em 96 h de fermentação os pHs dos meios subiram para 7,2 (Fig. 7E).

Em meios constituídos por água amarela diluída 10 vezes, a máxima produção média da Exo-PG foi de 0,5 U/mL, em 96 h, no pH 4,5, 0,36 U/mL no pH 5,5 e 0,27 U/mL no pH 5,0 a 24 h (Fig. 8A). Os teores de açúcares redutores, após 48 h de fermentação, indicaram um consumo médio de cerca de 60% em todos os pHs e, após 72 h, estes foram quase totalmente consumidos em todos os meios (Fig. 8B).

Os níveis de proteína seguiram os mesmos padrões anteriores, ou seja, caíram para cerca de 10 a 12 µg/mL em 48, sobem para até 18,75 µg/mL em 72 h e novamente diminuem para cerca de 12,5 µg/mL em 96 h (Fig. 8C). O crescimento microbiano foi máximo a 72 h, com 0,8 mg/mL nos pHs 5,0 e 5,5 e 0,6 mg/mL no pH 4,5 (Fig. 8D). Neste último, os pHs caíram para 4,0-4,5 e, posteriormente, subiram para 6,5 (Fig. 8E).

A análise de variância dos dados da produção de Exo-PG foi feita para as diferentes diluições de água amarela ao longo de 96 horas de cultivo (Tabela 1, ensaio 2 dos materiais e método), indicando que separadamente, as diluições do meio cultivo e o tempo de cultivo afetaram a produção da enzima a 1% de probabilidade, segundo o teste F, enquanto que o pH não apresentou diferenças significativas a 5% de probabilidade.

As análises estatísticas mostraram ainda que a interação dos fatores “diluição da água amarela” com o “tempo de cultivo” levou a produzir uma diferença significativa, a 1% de probabilidade, na produção da enzima, segundo o teste F. A média geral do ensaio foi de 0,20 U/mL, o desvio foi de 0,25 U/mL e o coeficiente de variação foi de 123,37 U/mL (Tab. 4).

Foi aplicado o teste de Tukey para os fatores “meio de cultivo” utilizado “pH” e “tempo de cultivo”. O teste revelou que água amarela sem diluição proporcionou uma maior produção da enzima com uma média de 0,37 U/mL. Não houve, entretanto, diferenças entre o resíduo bruto e a diluição de 4 vezes assim como, entre a produção da enzima no meio diluído 4 vezes. As demais médias de produção ficaram abaixo de 0,232 U/mL (Tab. 4). Para os fatores pH e tempo de cultivo também foi aplicado o teste de Tukey, o qual mostrou que o melhor pH para a produção de PG foi o de 5,0, com 0,22 U/mL, em média, e o melhor tempo de cultivo foi de 96 horas de fermentação com 0,38 U/mL (Tab. 5).

3.1.3. Seleção da melhor fonte de carbono para produção da PG

Depois de analisados oito meios de cultivo diferentes para a produção de Exo-PG, foram selecionados os meios de bagaço de laranja e água amarela bruta cujos resultados foram submetidos estatisticamente à análise de variância comparando os dois blocos. A ANOVA mostrou que, a fermentação utilizando o bagaço de laranja (ensaio 1) e a água amarela sem diluição (ensaio 2) foram capazes de afetar significativamente a produção de Exo-PG a 5% de probabilidade. Além disso, os meios de cultivo e o tempo de cultivo afetaram, separadamente, a produção da enzima, a 5% de probabilidade, segundo o teste F, enquanto que a variação do pH inicial não levou diferenças significativas, a 5% de probabilidade. Quando esses fatores interagem entre si, a análise estatística mostrou que nenhuma das interações foi capaz de produzir uma diferença significativa a 5% de probabilidade, na produção da enzima, segundo o teste F (Tab. 6). A média geral do ensaio foi de 0,54 U/mL, o desvio foi de 0,60 U/mL e o coeficiente de variação foi de 110,97 U/mL.

Foi aplicado o teste de Tukey para os fatores “meio de cultivo” utilizado “pH” e “tempo de cultivo”. O teste revelou que o bagaço de laranja usado como

fonte de carbono, proporcionou uma maior produção da enzima em relação a água amarela, com uma média de 0,70 U/mL. Para os fatores pH e tempo de cultivo também foi aplicado o teste de Tukey, que mostrou que o melhor pH utilizado foi o de 5,5 com 0,61 U/mL e o melhor tempo de cultivo foi de 96 horas de fermentação com 0,94 U/mL em média (Tab. 7).

4. Discussão

O tempo de fermentação mostrou-se importante para a produção da poligalacturonase (PG) onde as melhores produções ocorreram em 96h, o qual foi o tempo limite testado nos ensaios, exceto nos meios contendo farelo de trigo e pectina de citrus como fonte de carbono. Muitas vezes a produção máxima de pectinases e outras enzimas despolimerizantes ocorrem ao final período fermentativo. Essa característica foi observada no *Bacillus pumilus* em meio de pectina de citrus e extrato de levedura. A produção da enzima ocorreu de maneira crescente até 50h de fermentação (tempo limite testado) (SHARMA e SATYANARAYANA 2006). O mesmo ocorreu com PATIL e DAYANAND (2005) que estudaram a produção de pectinases em duas linhagens de *Aspergillus niger* em fermentação submersa utilizando como fonte de carbono o pó da semente de girassol suplementada com cascas de sementes de grama verde e vermelha e uma variedade de grama de bengali. As melhores condições para a produção das enzimas foram em períodos de 120h de fermentação, utilizando a casca da grama verde como suplementos adicional, acrescida de 4% de glicose e 0,3% de sulfato de amônia.

As maiores atividades da Exo-PG foram detectadas em meios cujas fontes de carbono foram o extrato do bagaço de laranja a 3% e água amarela sem diluição, os quais continham concentrações muito diferentes de açúcares redutores (1 mg/mL e 7,0 mg/mL / 24 h, respectivamente). Os açúcares presentes nestes meios podem ser constituídos não só de glicose e frutose, mas também de resíduos de pectina nas formas de mono, di, tri e polissacarídeos que, além de promoverem o crescimento microbiano ainda agiriam como indutores da produção de Exo-PG. Os meios que continham grandes quantidades de açúcares propiciaram uma maior produção de biomassa (farelo de trigo e água amarela sem diluição) com cerca de 3 a 5,8

mg/mL em 48/72 h. Para os demais meios essa produção não passou de 2,4 mg/mL, inclusive no meio que proporcionou a melhor produção da enzima que foi o bagaço de laranja, porém, a produção de biomassa quando comparada a produção de enzima revelou que o meio contendo bagaço de laranja foi o que obteve um maior rendimento na produção com 0,38 - 0,96 U/mg biomassa em 96 h enquanto a água amarela sem diluição e o farelo de trigo obtiveram um rendimento máximo de 0,12 U/mg de biomassa nas mesmas condições anteriores.

O consumo de açúcares prontamente assimiláveis no meio se faz necessário para a produção de biomassa fúngica e colonização do meio de fermentação (SATO e SUDO, 1999). Porém, à medida que esses açúcares prontamente assimiláveis vão se esgotando o microrganismo começa a produzir outras enzimas hidrolíticas para obtenção de outras fontes de carbono (BOTELLA et al., 2005). Além disso, a redução desses açúcares prontamente assimiláveis do meio de fermentação é importante para se evitar a repressão catabólica e iniciar a produção das enzimas despolimerizantes (SOLÍS-PEREIRA et al., 1993; ACUÑA-ARGÜLLES et al., 1995; HANG e WOODAMS, 1994). Entretanto, meios constituídos por açúcares prontamente assimiláveis como a glicose ao serem misturados a outras fontes de carbono podem, além de aumentar a produção de biomassa, a secreção de enzimas despolimerizantes como relatado por TEIXEIRA et al. (2000) onde puderam determinar que níveis de 0,5% de pectina com 0,5% de glicose promoveram a máxima produção de Exo-PG em 48 h de FSM e que estas fontes de carbono quando adicionadas a altas concentrações teriam efeito de repressão catabólica para a Exo-PG.

Meios mais diversificados em relação a fontes de carbono contendo açúcares indutores para produção de pectinases acrescidas de outras fontes de carbono também foram utilizados por RUNCO et al. (2001) que estudaram a regulação da produção de poligalacturonase pelo *Aspergillus terreus* em FSM, utilizando como fontes de carbono o ácido poligalacturônico, glicose, frutose e galactose, além de vários aminoácidos. A maior produção de PG ocorreu em meio contendo apenas o ácido poligalacturônico (5 g/L) com 0,8 U/mL. A produção de enzima foi reprimida, em meios contendo glicose, frutose e

galactose. Em meios contendo estes açúcares acrescidos do ácido poligalacturônico notou-se um aumento da produção de PG.

A produção máxima de biomassa para o *P. viridicatum* ocorreu entre 48 e 72 h, sendo proporcional ao consumo de açúcares redutores nos diferentes meios testados. A máxima produção da Exo-PG coincidiu com a fase estacionária de crescimento do fungo, ao final da fermentação (72 – 96 h), exceto nos meios com farelo de trigo em sua composição e com pectina de citrus cuja máxima produção ocorreu em 24 h. A produção de pectinases na fase estacionária de crescimento também é relatada por SERRAT et al. (2002) para a PG produzida pelo *Kluyveromyces marxianus*, em FSM, com meios suplementados com 1 e 10% de glicose e por MALDONADO e STRASSER DE SAAD (1998) reportam uma produção de biomassa de até 10 mg/mL em FSM de meios suplementados com 20 mg/mL de glicose e que esta produção de biomassa diminuiria a medida que os níveis de glicose eram reduzidos em 50%.

Ao longo do processo fermentativo os diferentes meios testados sofreram variações no pH. Apesar dos meios terem seus pHs iniciais corrigidos para 4,5, 5,0 e 5,5 estes sofrem em sua maioria, nos primeiros períodos de fermentação, uma redução em 0,5 a 1 unidade de pH, provavelmente decorrente da produção de ácidos orgânicos. A produção desses ácidos seria uma outra consequência da degradação das fontes de carbono. Posteriormente, notou-se um aumento do pH que chegou entre 6,0 e 8,0. Esse aumento no pH poderia ser resultado do consumo desses ácidos orgânicos produzidos na primeira fase da fermentação. Além disso, a atuação de proteases secretadas pelo microrganismo causaria uma possível desaminação de proteínas, gerando aminas que também poderiam levar a alcalinização do meio (AKIMITSU et al., 2005; SHARMA e SATYANARAYANA, 2006). Contudo, outros meios como o contendo pectina de citrus como fonte de carbono e água amarela sem diluição, não sofreram grandes alterações no pH, os quais, após uma leve acidificação em 24 h, permanecem constantes durante toda a fermentação.

A variação de pH durante a fermentação pode ser considerada um fator positivo na produção de diferentes pectinases, pois a transcrição, tradução e secreção dessas enzimas têm sido descritas como reguladas por um

mecanismo dependente do pH (AKIMITSU et al., 2005). O pH, além de afetar os níveis de transcrição e tradução da PG ainda poderia atuar como uma espécie de sinalizador fazendo com que as enzimas permaneçam inativas dentro do micélio fúngico, por uma glicosilação na estrutura protéica até que as condições de pH tornem-se favoráveis para ação da enzima quando esta seria secretada (MALDONADO e STRASSER DE SAAD 1998; LANG e DÖRNENBURG, 2000). Variações no pH do meio fermentativo são descritas por YAKOBY et al., (2000) que estudaram a indução de pectinases produzidas por *Colletotrichum gloeosporides* inoculado em meio contendo ácido poligalacturônico e pectina de citrus como fontes de carbono em pHs variando de 3,8 a 6,5. Quando o cultivo ocorreu em meio com pH inicial de 3,8 foi observado apenas o crescimento microbiano, sem a síntese de pectinases. A síntese de poligalacturonase e pectina liase só iniciou-se em pH 5,0 aumentando até o pH de 5,7.

Os níveis de proteína sofreram variações ao longo da fermentação. FAWOLE e ODUNFA (2003) verificaram que os níveis de proteína subiam gradualmente de ~7 para 25 mg/mL em 168h de cultivo na FSM do *A. niger*. Dados similares foram obtidos por OLSSON et al., (2003) utilizando o *T. reesei* em FSM de meios contendo celulose, polpa de beterraba e sua forma alcalinizada. No meio contendo celulose houve um aumento gradual dos níveis protéicos até 96h (~0,30 g/L), seguido de uma diminuição constante em 120-140h de cultivo (~0,28 g/L). Nos meios contendo polpa de beterraba observaram um pico de proteína em 60 h (0,50 g/L), seguido da constante queda nesses níveis para até 0,10 g/L em 140 h. Quando esse meio foi alcalinizado, esses níveis de proteína não passaram de 0,10 g/L durante toda a fermentação.

5. Conclusões

? Os resíduos agro-industriais utilizados como fonte de carbono e o tempo de fermentação influenciaram na produção de exo-poligalacturonase pelo *Penicillium viridicatum* RFC3.

? O bagaço de laranja mostrou ser a melhor fonte de carbono para a produção de Exo-PG pelo *Penicillium viridicatum* RFC3 em fermentação submersa, seguido pela água amarela.

? Em relação às condições de cultivo, o melhor tempo para a produção de Exo-PG foi de 96 h.

? Apesar de não interferir significativamente, o pH inicial do meio de 5,5 foi o mais adequado para a produção da enzima.

? Um tempo maior de fermentação poderia ser testado para a produção de Exo-PG.

6. Referências Bibliográficas

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.

AKIMITSU, K., ISSHIKI, A., OHTANI, K., YAMAMOTO, H., ESHEL, D., PRUSKY, D. Sugars and pH: A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. **Phys. Mol. Plant Pathol.**, 2005 (in press).

ALAÑA, A., LLAMA, M. J., SERRA, J. L. Purification and some properties of the pectin lyase from *Penicillium italicum*. **FEBS Lett.**, v.20, n.2, p.335-340, 1991.

ALAZARD, D., RAIMBAULT, M. Comparative study of amylolytic enzyme production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state cultivation. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.12, p.113-117, 1981.

BOTELLA, C., DE ORY, I., WEBB, C., CANTERO, D., BALNDINO, A. Hydrolitic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochem. Eng. J.** v.26, p.100-106, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 284-254, 1976.

BUSTO, M.D., GARCÍA-TRAMONTÍN, K.E., ORTEGA, N., PEREZ-MATEOS, M. Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. **Biores. Technol.**, 2005 (in press).

ÇINAR, I. Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids. **Process Biochem.**, v. 40, i. 2, p. 945-949, 2005.

- DEVI, N. A., RAO, A. G. A. Fractionation, purification, and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. **Enz. Microbiol. Technol.**, v. 18, p.59-65, 1996.
- ESPACHS-BARROSO, A., SOLIVA-FORTUNY, R. C., MARTÍN-BELLOSO, O. A natural clouding agent from orange peels obtained using polygalacturonase and cellulose. **Food Chem.**, v. 92, i. 1, p. 55-61, 2005.
- FAWOLE, O. B., ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **Int. Biodet. Degrad.**, v. 52, p. 223-227, 2003.
- FORGATY, W. M., WARD, O. P. Pectinases and pectic polyssacharides. In: Hockenull, D. J. D. (ed) **Progress in industrial microbiology**. London: **Churchill Livingstone**, v. 13, p. 59-119, 1974.
- HADJ-TAIEB, N., AYADI, M., KHLIF, M., MRAD, K., HASSAIRI, I., GARGOURI, A. Fermentor production of pectinases on gruel, a local by-product and their use in olive oil extraction. **Enz. Microbiol. Technol.**, 2006, (In Press)
- HANG, Y.D., WOODANMS, E.E. Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. **Lebensm. Wiss. U. Techno.**, v. 27, p.194-196, 1994.
- HOLST, O., MANELIUS, A., KRAHE, M., MÄRKL, H., RAVEN, N., SHARP, R. Thermophiles and fermentation technology. **Comparative Biochem. Physiol.**, v. 118 A, p. 415-422, 1997.
- LANG, C., DÖRNENBURG, H., Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.53, p.366-375, 2000.
- LOUW, C., LA GRANGE, D., PRETORIUS, I.S., VAN RENSBURG, P. The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavour. **J. Biotech.**, 2006 (In Press).
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. cap.5, p.96-101. (in) **Microbiologia de Brock**. Kiaw, C. M. (trad.),São Paulo, Prentice Hall, 2004
- MALDONADO, M. C., STRASSER DE SAAD, A. M. Production of pectinesterase na dpolygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. **J. Industr. Microbiol. Biotechnol.**, v.20, p.34-38, 1998.
- MILLER, G.L. Use of dinitrossalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 6-428, 1959.
- OLSSON, L., CHRISTENSEN, T. M. I. E., HANSEN, K. P., PALMQVIST, E. A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enz. Microbiol. Technol.**, v. 33, p. 612-619, 2003.
- PATIL, S. R., DAYANAND, A. Production of pectinases from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid state conditions. **Biores. Technol.** 2005 (in press).

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

ROMBOUTS, F.M., PILNIK, W. **Pectic enzymes**. In: Economic Microbiology, ed. ROSE, A.H., Academic Press, London, v.5, p.227-282, 1980 (**Apud**) DOELLE, H. W., MITCHELL, D. A., ROLZ, C. E. (ed.) **Solid Substrate Cultivation**, Elsevier Science Publishers Ltd, London, 463p, 1992.

RHA, E.; PARK, H. J.; KIM, M. O.; CHUNG, Y. R.; LEE, C.; KIM, J. W. Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinera*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, p. 105-109, 2001.

RUNCO, R., NAVARRO, A. R., MALDONADO, M. Regulation of polygalacturonase by *Aspergillus niger*. **World. J. Microbiol. Biotechnol.**, v.17, p.487-491, 2001.

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

SATO, K., SUDO, S. 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. 1999.

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

SILVA, D. **Estudo da produção de pectinases por *Penicillium viridicatum* RFC3 através de fermentação semi-sólida de resíduos agrícolas**, São José do Rio Preto, 2003. 198 p. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE), **UNESP**, Universidade Estadual Paulista.

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

SIN, H.N., YUSOF, S., SHEIKH ABDUL HAMID, N., ABD. RAHMAN, R. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. **J. Food Eng.**, v. 73, i. 4, p. 313-319, 2006,

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

TAVARES, V. B., SIVIERI, K., CERON, C. R., DA SILVA, R., TRABUCO, E., LOMBARDI, F. R., 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**, v.21, n.6, p.722-725, 1998.

TEIXEIRA, M.F.S., LIMA FILHO, J.L., DURAN, N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. **Braz. J. Microbiol.**, v.31, p.286-290, 2000.

YAKOBY, N., KOBILER, I., DINOOR, A., PRUSKY, D. pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, n.3, p.1026-1030, 2000.

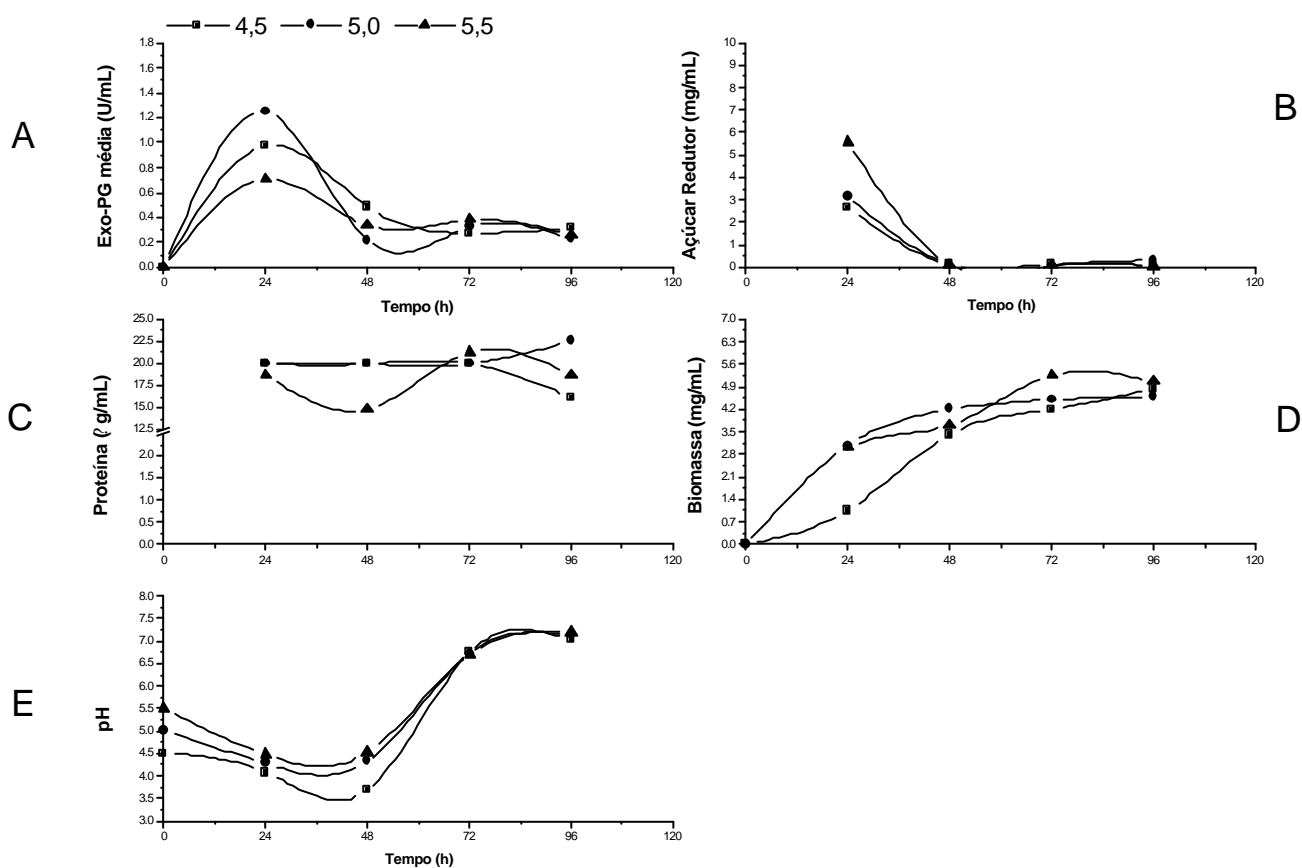


Figura 1: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio contendo extrato de farelo de trigo como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-□-), 5,0 (-●-) e 5,5 (-▲-).

A: Produção média de Exo-PG (U/mL)

B: Açúcares redutores (mg/mL)

C: Proteína dos meios (g/mL)

D: Biomassa produzida (mg/mL)

E: Variação do pH do meio ao longo da fermentação

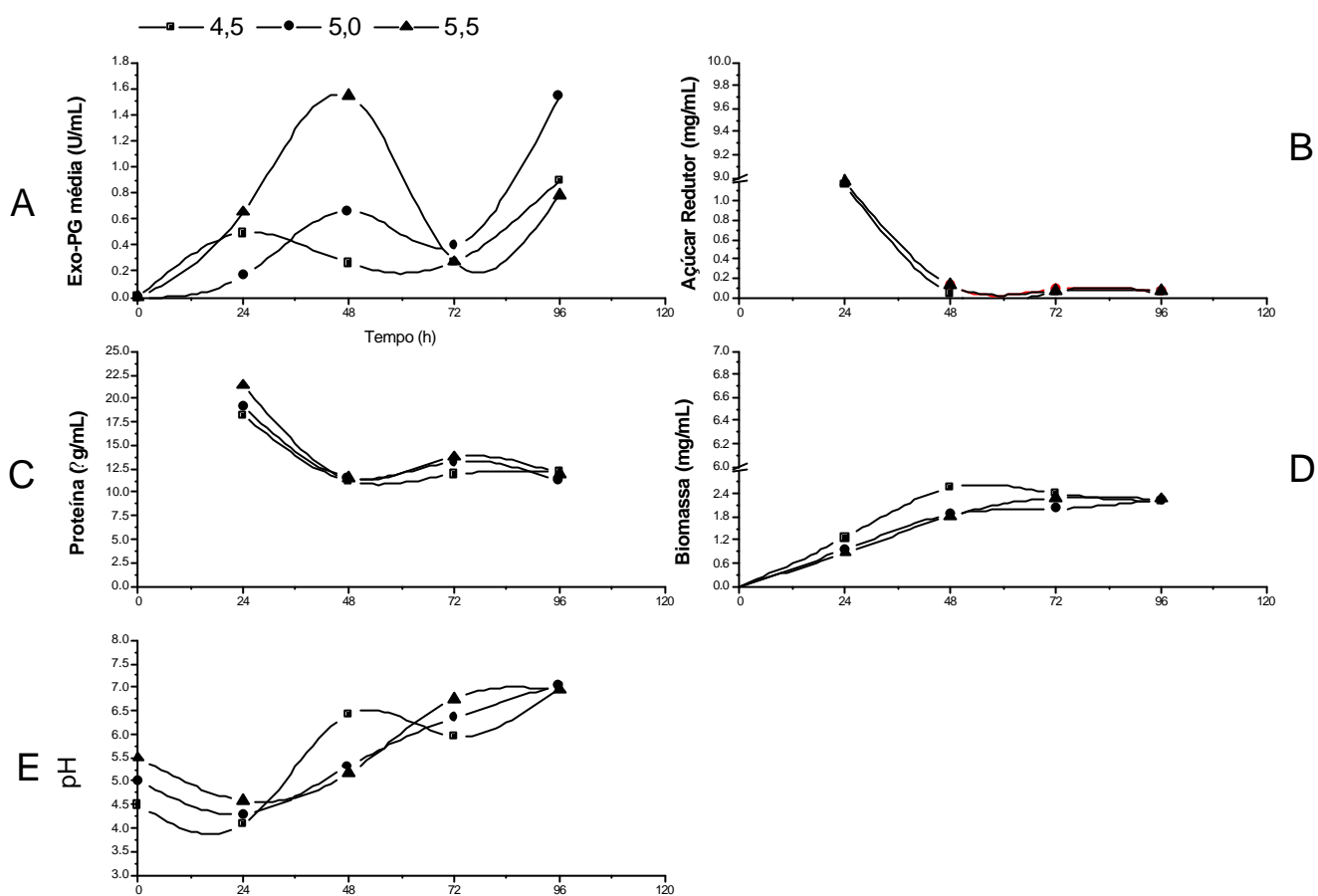


Figura 2: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio contendo extrato do bagaço de laranja como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-□-), 5,0 (-●-) e 5,5 (-▲-).

A: Produção média de Exo-PG (U/mL)

B: Açúcares redutores (mg/mL)

C: Proteína dos meios (?g/mL)

D: Biomassa produzida (mg/mL)

E: Variação do pH dos meios ao longo da fermentação

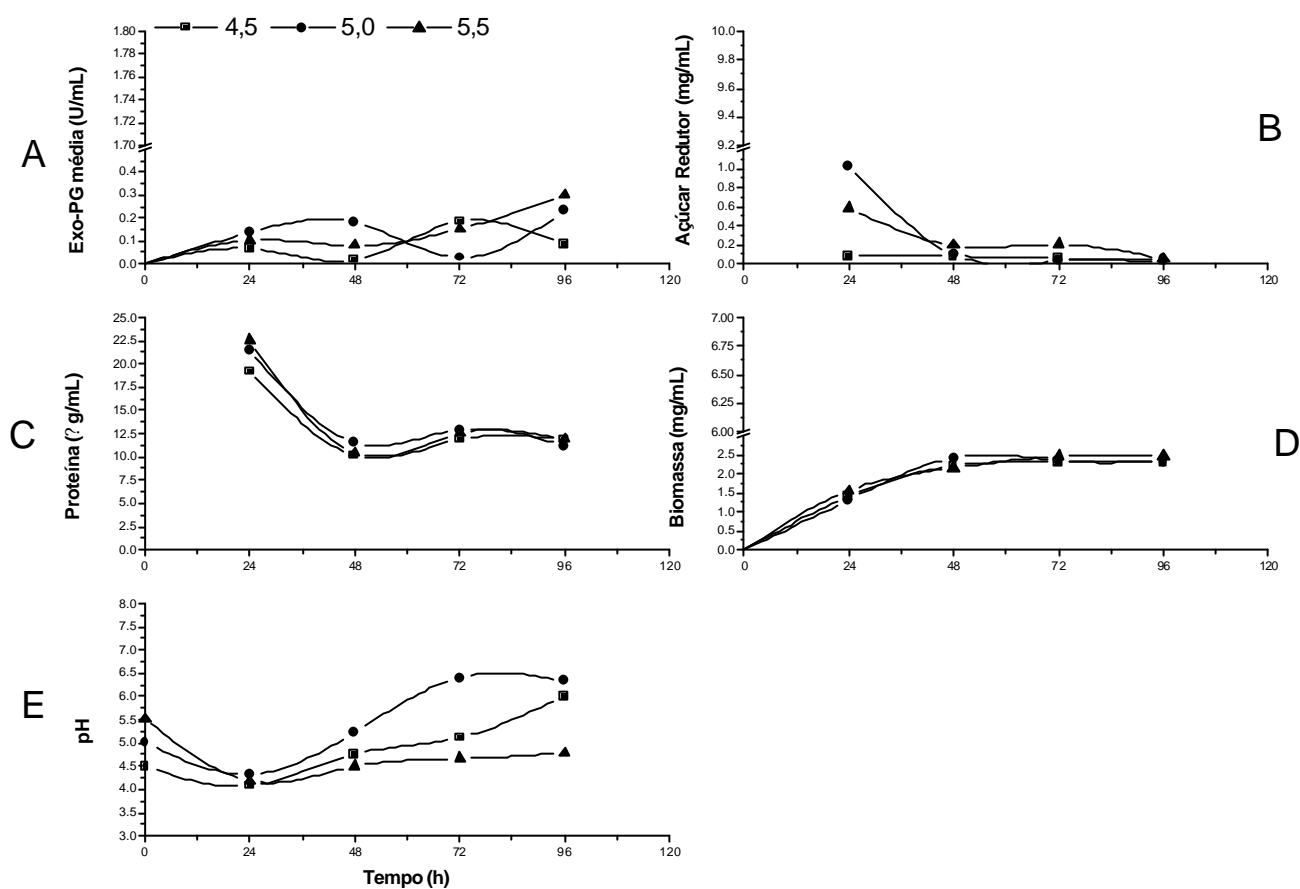


Figura 3: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio contendo extrato de farelo de trigo e bagaço de laranja (1:1 – p/p) como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-□-), 5,0 (-●-) e 5,5 (-▲-).

A: Produção média de Exo-PG (U/mL)

B: Açúcares redutores (mg/mL)

C: Proteína dos meios (g/mL)

D: Biomassa produzida (mg/mL)

E: Variação do pH do meio ao longo da fermentação

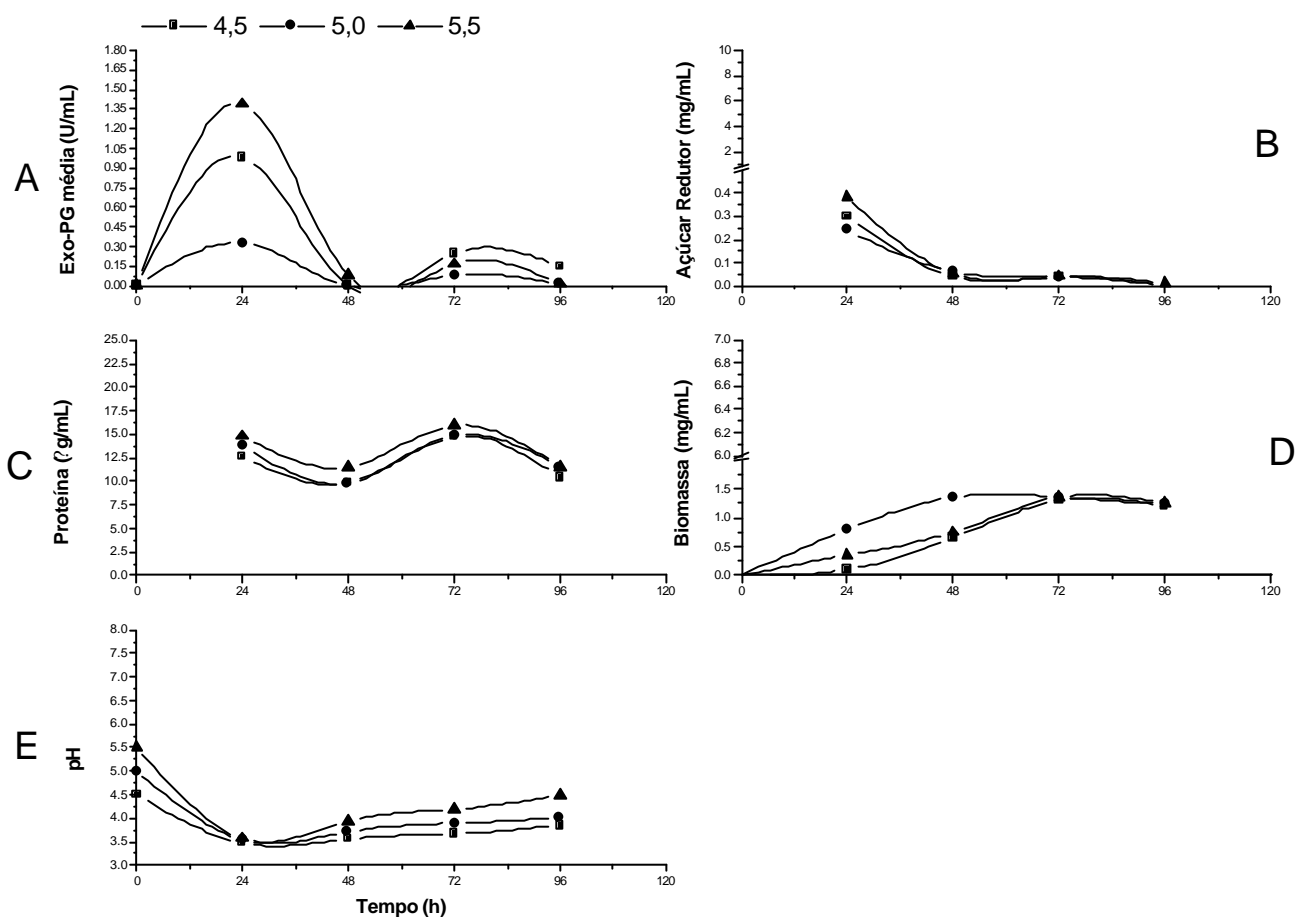


Figura 4: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio semi-sintético M1 contendo pectina como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-□-), 5,0 (-●-) e 5,5 (-▲-).

A: Produção média de Exo-PG (U/mL)

B: Açúcares redutores (mg/mL)

C: Proteína dos meios (g/mL)

D: Biomassa produzida (mg/mL)

E: Variação do pH do meio ao longo da fermentação

Tabela 2: Análise de variância da produção de Exo-PG através da fermentação submersa (FSM) de vários meios de cultivo.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Meios(m)	3	4,7454	1,5818	4,9903**
pH (p)	2	0,5201	0,2600	0,8204 ^{NS}
Tempo (t)	3	0,6308	0,2103	0,6633 ^{NS}
Fator m x p	6	1,0615	0,1769	0,5581 ^{NS}
Fator m x t	9	6,8738	0,7638	2,4095*
Fator p x t	6	1,5674	0,2612	0,8241 ^{NS}
Fator m x p x t	18	4,5356	0,2520	0,7949 ^{NS}
(Tratamentos)	47	19,9346	0,4241	-
Resíduo	96	30,4298	0,3170	-
Total	143	50,3644	-	-

^{NS} Interação não significativa, ** Interação significativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Tabela 3: Teste de Tukey para as médias dos meios de cultivo, pH e tempo de fermentação, utilizados nos ensaios fermentativos para a produção de Exo-PG.

Meio de cultivo (? = 0,3474)	pH (? = 0,2739)	Tempo (? = 0,3474)
Laranja (0,6981 ^A)	5,5 (0,510 ^A)	96 (0,5136 ^A)
Trigo (0,4786 ^{AB})	5,0 (0,4175 ^A)	24 (0,4694 ^A)
M1 (0,3428 ^B)	4,5 (0,3658 ^A)	48 (0,4039 ^A)
T/L (0,2064 ^B)		72 (0,3389 ^A)

* M1 (meio utilizando pectina citrus 67% esterificação), T/L (meio de farelo de trigo com bagaço de laranja – 1:1-p/p)

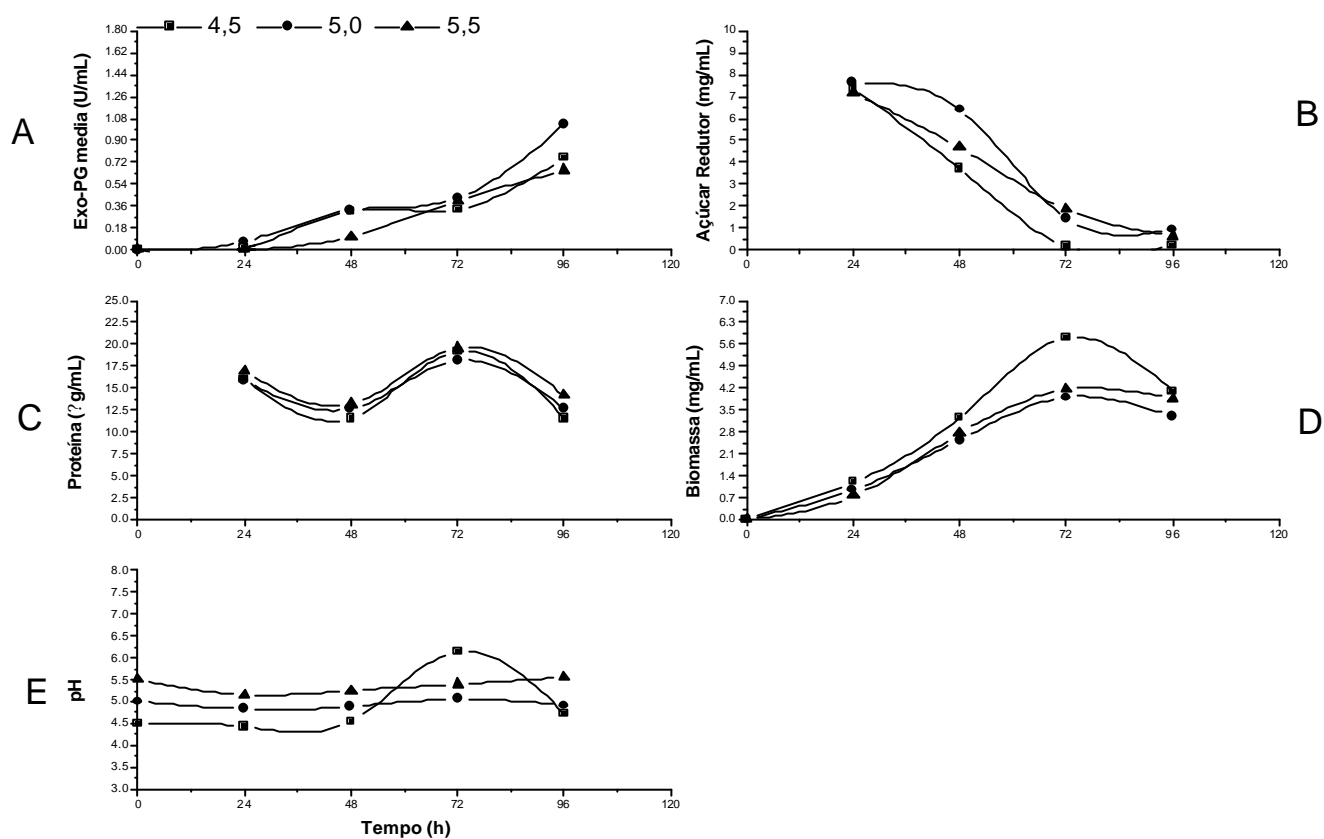


Figura 5: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio contendo Água Amarela (s/ diluição) como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-|-), 5,0 (-?-) e 5,5 (-? -).

A: Produção média de Exo-PG (U/mL)

B: Açúcares redutores (mg/mL)

C: Proteína dos meios (? g/mL)

D: Biomassa produzida (mg/mL)

E: Variação do pH do meio ao longo da fermentação

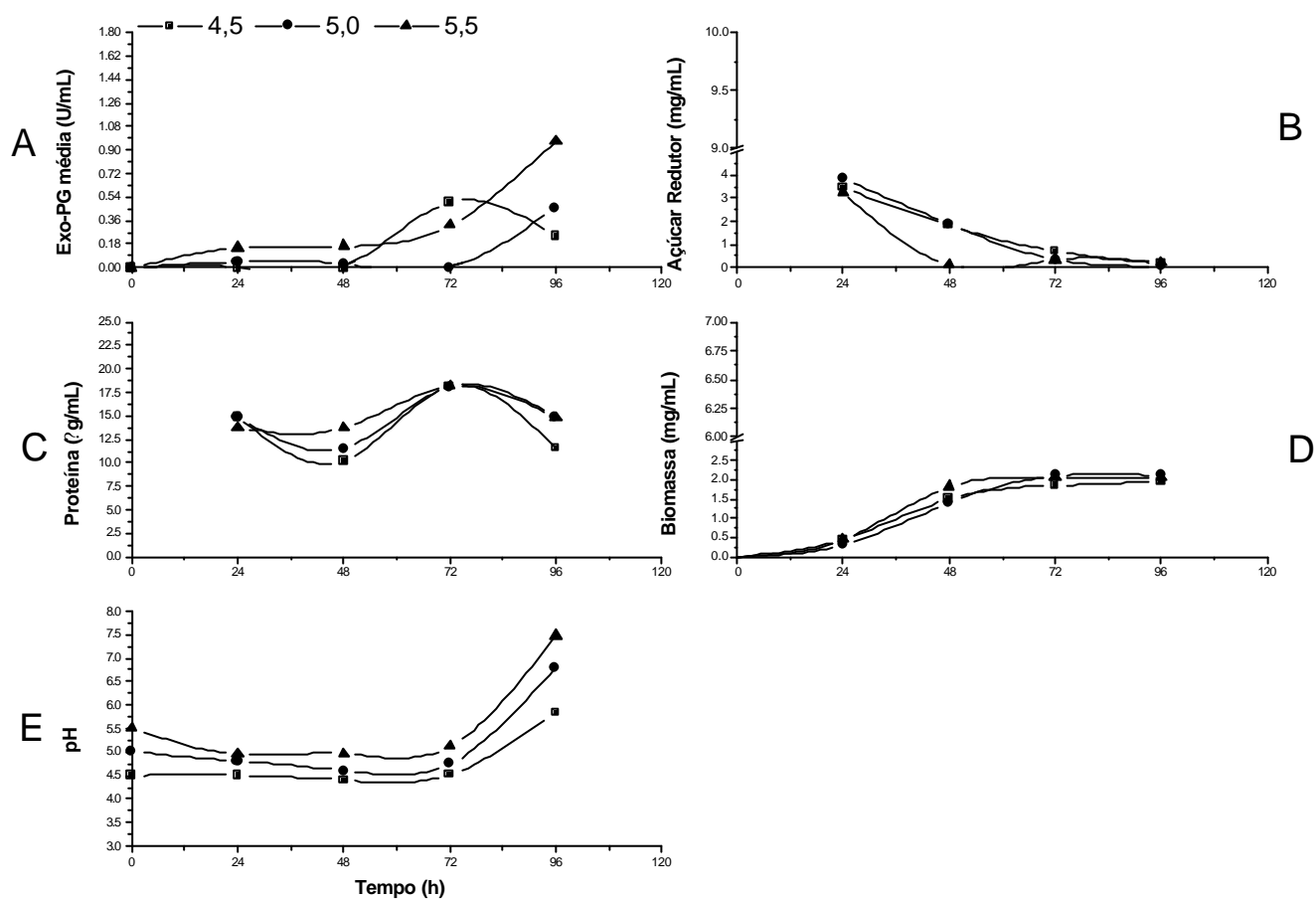


Figura 6: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio contendo Água Amarela (diluída 2x) como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (□ -), 5,0 (● -) e 5,5 (▲ -).

A: Produção média de Exo-PG (U/mL)

B: Açúcares redutores (mg/mL)

C: Proteína dos meios (g/mL)

D: Biomassa produzida (mg/mL)

E: Variação do pH do meio ao longo da fermentação

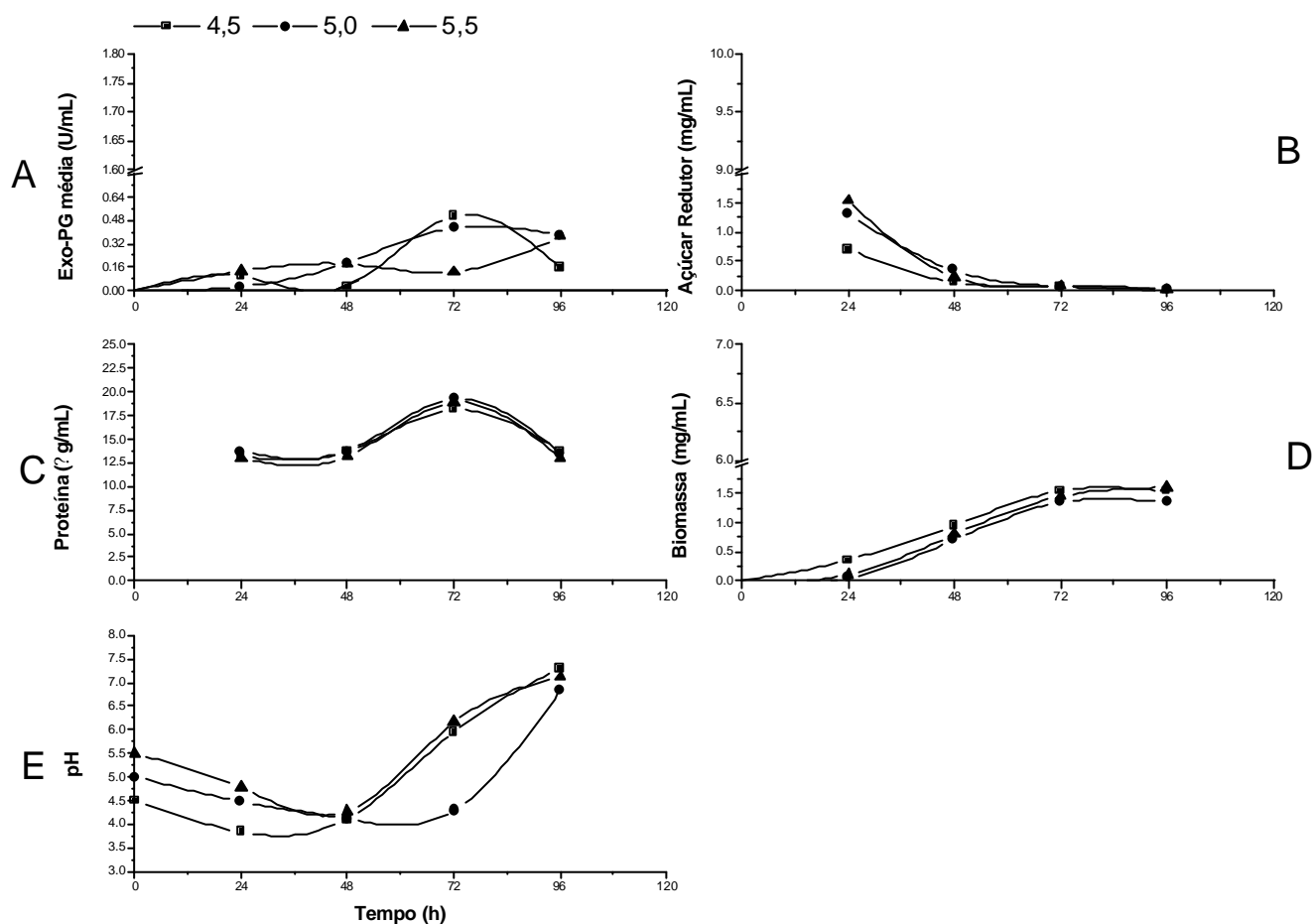


Figura 7: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio contendo Água Amarela (diluída 4x) como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-□-), 5,0 (-●-) e 5,5 (-▲-).

- A: Produção média de Exo-PG (U/mL)
- B: Açúcares redutores (mg/mL)
- C: Proteína dos meios (g/mL)
- D: Biomassa produzida (mg/mL)
- E: Variação do pH do meio ao longo da fermentação

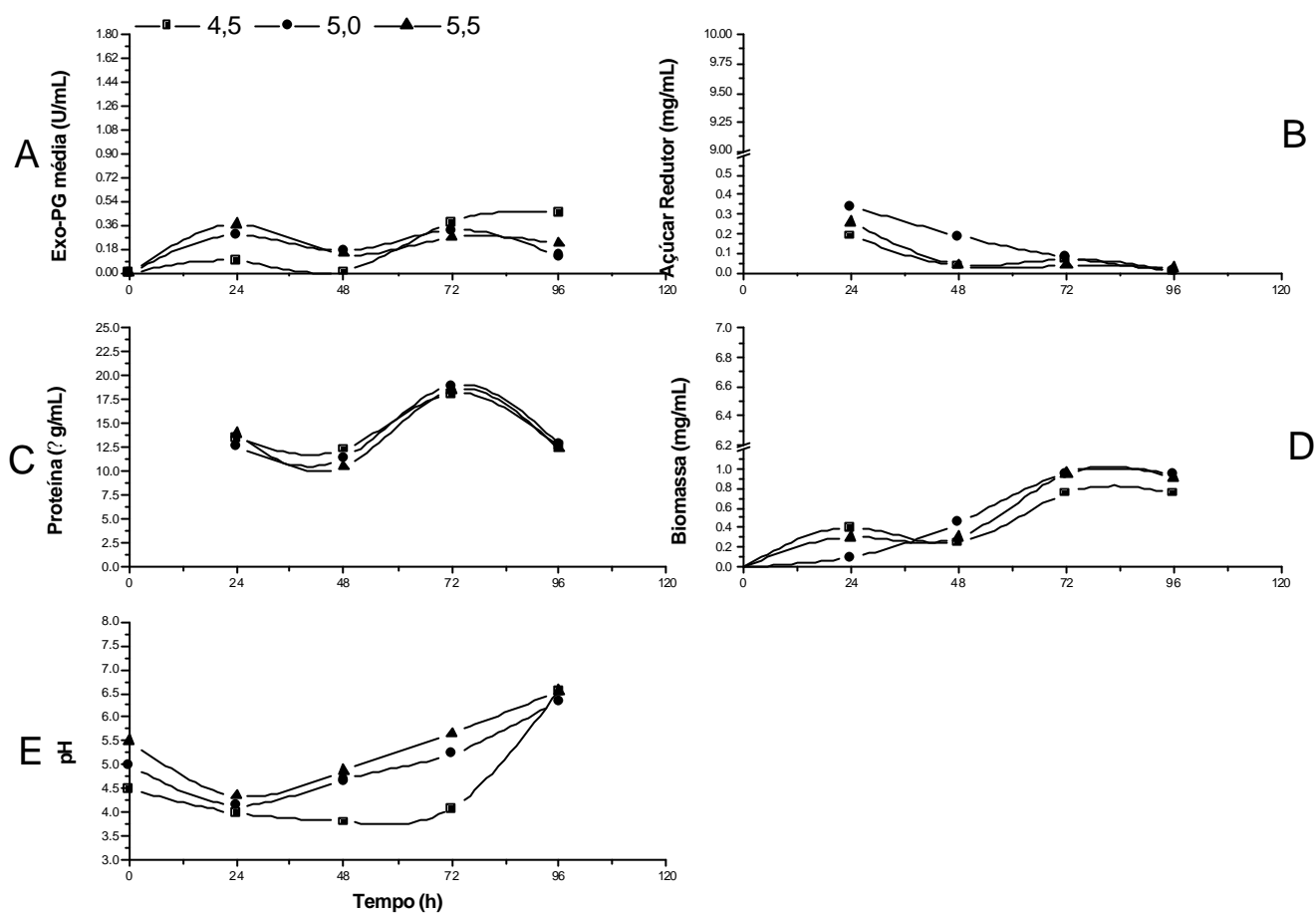


Figura 8: Fermentação Submersa do *Penicillium viridicatum* em meio contendo Água Amarela (diluída 10x) como fonte de carbono com pH inicial de 4,5 (-□-), 5,0 (-●-) e 5,5 (-▲-).

A: Produção média de Exo-PG (U/mL)

B: Açúcares redutores (mg/mL)

C: Proteína dos meios (?g/mL)

D: Biomassa produzida (mg/mL)

E: Variação do pH do meio ao longo da fermentação

Tabela 4: Análise de variância da produção de Exo-PG através da fermentação submersa (FSM) de várias diluições de água amarela.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Resíduos(r)	3	1.8126	0,6042	9,6147**
pH (p)	2	0,0193	0,0097	0,1536 ^{NS}
Tempo (t)	3	2,1223	0,7074	11,2577**
Fator r x p	6	0,2280	0,0380	0,6048 ^{NS}
Fator r x t	9	1,9700	0,2189	3,4833**
Fator r x t	6	0,2458	0,0410	0,6519 ^{NS}
Fator r x p x t	18	0,6698	0,0372	0,5922 ^{NS}
(Tratamentos)	47	7,0679	0,1504	-
Resíduo	96	6,0327	0,0628	-
Total	143	13,1006		-

^{NS} Interação não significativa, ** Interação significativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Tabela 5: Teste de Tukey para as médias da água amarela, pH e tempo de cultivo, utilizados nos ensaios fermentativos para a produção de Exo-PG.

A. Amarela diluída (? = 0,1547)	pH (? = 0,1219)	Tempo (? = 0,1547)
0X (0,3711 ^A)	5,0 (0,2192 ^A)	96 (0,3853 ^A)
4x (0,2319 ^{AB})	4,5 (0,1983 ^A)	72 (0,2389 ^{AB})
2x (0,1364 ^{BC})	5,5 (0,1921 ^A)	48 (0,1144 ^{BC})
10x (0,0733 ^C)		24 (0,0742 ^C)

Tabela 6: Análise de variância da produção de Exo-PG através da fermentação submersa (FSM) de Água Amarela (sem diluição) e Bagaço de Laranja Batido.

Causas de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Resíduos(r)	1	1,8368	1,8368	4,5406*
pH (p)	2	0,4064	0,2032	0,5023 ^{NS}
Tempo (t)	3	4,9497	1,6499	4,0786*
Fator r x p	2	0,9812	0,4906	1,2127 ^{NS}
Fator r x t	3	1,4204	0,4735	1,1704 ^{NS}
Fator r x t	6	2,6793	0,4466	1,1039 ^{NS}
Fator r x p x t	6	2,5155	0,4192	1,0364 ^{NS}
(Tratamentos)	23	14,7892	0,6430	-
Blocos	2	2,5406	1,2703	3,4623*
Resíduo	46	16,8770	0,3669	-
Total	71	34,2067	-	-

^{NS} Interação não significativa, ** Interação significativa a 1% de probabilidade, * Interação significativa a 5% de probabilidade.

Tabela 7: Teste de Tukey para produção de Exo-PG através da fermentação submersa (FSM) de Água Amarela (sem diluição) e Bagaço de Laranja Batido.

Resíduos (? = 0,3016)	pH (? = 0,4440)	Tempo (? = 0,5644)
B. Laranja (0,7056 ^A)	5,5 (0,6100 ^A)	96 (0,9444 ^A)
A. Amarela (0,3861 ^B)	5,0 (0,5871 ^A)	48 (0,6050 ^{AB})
	4,5 (0,4404 ^A)	72 (0,3794 ^B)
		24 (0,2544 ^B)

VI. CAPITULO IV

**Purification and characterization of a
polygalacturonase from *Penicillium viridicatum* RFC3
produced in submerged fermentation using orange
bagasse as carbon source.**

**Dênis Silva^{1*}, Eduardo da Silva Martins¹, Rodrigo Simões Ribeiro Leite¹,
Roberto da Silva¹ and Eleni Gomes¹**

¹ Unesp (State University of São Paulo) – IB (Biology Institute)- Rio Claro, São Paulo, Brasil

* Corresponding author: Eleni Gomes, Unesp- IBILCE, Biology Department, Rua Cristovao Colombo, 2265, Jd. Nazareth, São José do Rio Preto, S.P., Brazil, cep 15054-000, phone nº +55 17 32212393, fax +55 17 32212390e-mail: eleni@ibilce.unesp.br

Abstract

The polygalacturonase from *Penicillium viridicatum* RFC3 obtained by submerged fermentation, was purified to homogeneity by chromatography on Sephadex G-75 and Q Sepharose columns. The molecular weight of the enzyme was 92,240 Da. Maximal activity was observed at pH 5.0 and at 50 - 55°C. The enzyme shown to be a exopolygalacturonase, as based to formation of acid galacturonic as its reaction products. Metal ions, such as Ca²⁺, increased 30% of activity and stability of enzyme. The K_m was 1.30 and 1.16 mg ml⁻¹ and the V_{max} was 1.76 and 2.07 μmol min⁻¹ mg⁻¹ when ion Ca²⁺ was added to reaction.

Key Words: *Polygalacturonase, Penicillium, submerged fermentation*

Abbreviations: PG, polygalacturonase; PMG, polymethylgalacturonase; PL, pectin lyase; BSA, bovine serum albumin; PAGE, polyacrylamide gel; SDS, sodium dodecyl sulfate,

1. Introduction

The enzymes that hydrolyse pectic substances are known as pectinases. They are classified in two main groups, namely pectinesterases (PE) that are able to de-esterify pectin by removal of methoxyl residues and depolymerases which readily split the main polygalacturonic chain. The depolymerising enzymes are divided into polygalacturonases (PG), that cleave the glycosidic bonds by hydrolysis, and lyases (PL), which cleave the glycosidic bonds by β -elimination. In addition, the latter two types of enzymes are classified on the basis of their preference to hydrolyse pectin, pectic acid or oligogalacturonate besides their pattern of action that can be random (endo-) or terminal (exo-) (Alkorta et al., 1998, Blanco et al., 1999, Kashyap et al., 2001).

The Polygalacturonases (PG) catalyze the hydrolysis of 1,4- β -D-galactosyluronic linkages and have been produced utilizing several carbon sources as pectic wastes from vegetable food processing industries. The pretreatment of with pectic enzymes facilitates removal of pectinaceous material and renders it suitable for decomposition by activated sludge treatment (Martins et al., 2002, Horikoshi, 1990, Tanabe et al., 1987, 1988). On the other hand, the use of this agricultural wastes as substrate for microbial grow is an alternative to reduce its pollution power and obtainment of higher commercial value products (Assaf et al., 2006; Nighojkar et al., 2006)

The PG have been purified from various sources as agricultural wastes and your properties comprehension was the role for the highest efficiency in application process (Devi and Rao, 1996; Kazuo et al., 2002, Niture and Pant, 2004, Celestino et al., 2006).

The present paper reports the production of polygalacturonase by *Penicillium viridicatum* RFC3 in submerged fermentation using orange bagasse

as carbon source, and purification and physicochemical properties of the enzyme.

2. Material and Methods

2.1. Microorganism

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 at 7°C.

2.2. Media, cultivation of microorganism and enzyme production

Polygalacturonase was produced by submerged fermentation (FSM) in a 500 ml Erlenmeyer flask containing 100ml of sterilized (120°C / 30 min) orange bagasse ground extract (3%) (provided by Bascitrus – Mirassol, SP). The filtered material plus 0,5% of citrus pectin (67-78% degree of esterification) was used as medium and inoculated with 10 ml of mycelial suspensions (approx. 10^7 spores ml^{-1}) from one culture slope.

The fermentation was carried out at 28°C and 110 rpm for 4 days, filtered and centrifuged at 10,000 g for 15min at 2°C. The supernatant was used as crude enzyme solution.

2.3. Enzyme activity measurements

Exo-polygalacturonase (Exo-PG) activity was assayed with a 1 % solution of 92% esterified citrus pectin (Sigma) in 0.2 M sodium acetate buffer (pH 4.5) at 45°C for 10 min. The reducing sugars was measured by Somogyi-Nelson reagent (Nelson, 1944; Somogyi, 1952). One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme releasing one μmol of galacturonic acid, per min.

Endo-polygalacturonase (Endo-PG) activity was measured viscosimetrically by adding 2 ml of crude enzyme to 6ml of acetate buffer (pH 4.5) containing 3% of 92% esterified citrus pectin (Sigma). The reaction mixture was incubated at 45°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.

2.4. Enzyme purification procedure

The crude enzyme solution obtained after 96 h of fermentation was dialyzed overnight against 20 mM acetate buffer, pH 4.5 and concentrated by ultrafiltration with Quixstand™ Benchtop of GE Healthcare at 10 kDa cut-off and loaded on Sephadex G-75 (Pharmacia) column (2.6 x 90 cm).

1300 ml of crude enzyme solution obtained after 96h of fermentation was dialyzed overnight against 20 mM acetate buffer, pH 4.5, and concentrated by ultrafiltration with Quixstand™ Benchtop of GE Healthcare at 50 and 10 kDa cut-off. The material was loaded on Sephadex G-75 (Pharmacia) column (2.6 x 90 cm) equilibrated with 40 mM acetate buffer (pH 4.5) and eluted with same the buffer at a flow rate of 18 ml h⁻¹ (0.3 ml min⁻¹). Protein fractions corresponding to the PG activity peak were pooled and applied on Q Sepharose column (Aldrich 30 x 1 cm) equilibrated with 40 mM acetate buffer, pH 4.5. The adsorbed material was eluted with a linear gradient from 0.0 to 1.0 M NaCl in the same buffer, at a flow rate of 60 ml h⁻¹. The PG peak activity were desalted by overnight dialysis against 20 mM acetate buffer, pH 4.5, at 4 °C.

2.5. Analytical electrophoresis

The molecular weight of the purified enzyme was determined by SDS-PAGE in a Mini Protean II apparatus (10 x 8 cm) (Biorad). Electrophoresis was carried out on a polyacrylamide composed of 4% (w/v) stacking gel and 10% (w/v) resolving gel in Tris/glycine buffer (pH 8.3) (Laemmli, 1970). Molecular weight marker 6.5 – 180 kDa – Sigma (M6539) was used. The protein band was visualized by silver staining.

Analytical isoelectric focusing-PAGE was performed with an Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing system (Amersham) on a 12.5% polyacrylamide gel (14 x 15 cm) containing 5% Pharmalyte (pH 3.0-10.0) supplied by GE Healthcare, in accordance with the instructions of the supplier. The gel was silver-stained for protein determination.

2.6. Protein estimation

Protein concentration was determined in the concentration range of 1-10 and 10-100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ by the microassay method of Bradford (1976), with bovine serum albumin (SAB) as the standard.

2.7. Enzyme characterization

PG activity was assayed as a function of pH, in McIlvaine buffer (pH 4.0 - 8.0), at 55°C with 1 % high-esterified citrus pectin (Sigma) as substrate. The effect of temperature on PG activity was determined in the acetate buffer, incubated at temperature between 35°C and 70°C, at the pH optimum.

The thermal stability was investigated by measuring the residual activity of the enzyme after 1h of incubation at temperatures between 5°C and 80°C. The “half-life” was determined by incubating the enzyme at 60°C for 1 h, and remaining activity was determined at the pH and temperature optima.

pH stability of the enzyme was evaluated by dispersing (1:1) enzyme solution in McIlvaine buffer solutions pH 3.0 - 8.0 and Glycine-NaOH buffer pH 8.0 - 10.5 and maintaining these solutions at 25°C for 24 h. An aliquot was taken to determine the remaining activity at the optimum pH and temperature.

The Michaelis constant (K_m) and V_{max} values were determined from Lineweaver-Burk plots of enzyme activity measured with citrus pectin as substrate, at concentrations between 1.0 and 10.0 mg ml^{-1} . The results are plotted utilizing the program Grafit 5.0™.

The effect of metallic ions on enzyme activity was evaluated at a concentration of 2.0, 5.0 and 10.0 mM in the reaction mixture, such as (Ag^+ , K^+ , Na^+ , Cr^+ , Cu^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} and EDTA).

To determine substrate specificity, solutions of polygalacturonic acid, citrus pectin with 26%, 92% degree of esterification (D.E) and apple pectin were used as substrates under optimal conditions for enzyme activity.

The product of the hydrolysis of 92%-esterified citrus pectin by PG were analyzed by paper chromatography on Whatman No. 1 paper, with ethyl acetate / isopropanol / water (6:3:1, by volume) as the mobile phase.

3. Results and discussion

3.1. Production of PG

In the fermentation media containing orange bagasse extracts as source of carbon was observed that the PG activity increased continuously between 24-96h of cultivation (Fig. 1). The influence of carbon source and the time of fermentation for PG production was reported by Maldonado and Strasser de Saad (1998) using *Aspergillus niger*, Teixeira et al. (2000) using *Aspergillus japonicus* and Serrat et al. (2002) using *Kluyveromyces marxianus*, in FSM using citrus pectin plus several glucose concentrations. The PG production increased at end of fermentative period, after glucose consumption and at end fungal growth.

The medium pH decreased at first 24 h of cultivation, and after 48 hours, a pH increased to neutralization at 96 h. The reducing sugars were almost totally consumed at 48 h of cultivation, reaching concentrations of 0.2 mg ml⁻¹. During the fermentation period, the biomass produced were lower at 2.5mg ml⁻¹. The logarithmic growth phase occurred between 0 – 48 h. The protein levels was reduced along the fermentative course reaching 30% of the initial value, at 96 h (Fig. 1).

The pH reduction in 0.5 to 1 unit, was probably due to the organic acids production or galacturonic acids liberation by the pectin hydrolyze. The pH subsequently increase could be resulted from those organic acids consumption produced in the first fermentation phase, besides a possible protein desamination, producing amines that would lead to the medium alcalinization (Silva et al., 2005).

Extra cellular enzymes from several fungi are synthesized and activated or repressed in function to external pH variation. pH acts as regulatory system signal mediate by genic expression of these enzymes (Dennison, 2000; Rollins and Dickman, 2001; Cotton et al., 2003; Brencic and Winans, 2005). Variations of the PG production in the fermentative medium are also described by Maldonado and Strasser De Saad (1998) and Yakoby et al. (2000) that studied the pectinases induction in *Aspergillus niger* and *Colletotrichum gloeosporides*. The cultivation medium was based in polygalacturonic acid and citrus pectin as carbon sources. The microorganisms grows in low pH, however, the enzymes production only occurred when the medium was increased at pH 5.0 - 6.5. The authors suggest that the pectinases production was mechanism pH dependent, and that enzymes could remain inactivated in intracellular medium, in glycosilated form. These enzymes must be secreted when the conditions of extracellular pH is favourable.

The consumption of reducing sugars promotes a better fungal growth and lead to success in the fermentative medium colonization (Sato and Sudo 1999). On the other hand, reducing sugars in the medium is important to avoid the catabolic repression (Solís-Pereira et al., 1993; Acuña-Argülles et al., 1995; Hang and Woodams, 1994). The glucose presence in the medium repressed the pectinases production, while sugars as galacturonates stimulated the enzymes production by *Aspergillus niger* CH4. Concentration of 0.5% of pectin plus 0.5% of glucose promoted the best Exo-PG production at 48h of FSM (Solís-Pereira et al. 1993, Teixeira et al. 2000).

3.2. Purification of PG

The crude enzymatic solution obtained after 96 of fermentation, was centrifuged at 10,000 g / 15 min at 4°C and submitted to ultrafiltration with 10 kDa cut-off and loaded on Sephadex G-75 column resulting in 5 peaks with PG activity (Fig. 2A).

1300mL of crude enzymatic solution, was submitted to ultrafiltration with membrane 50 kDa cut-off which activity yielding was 64.3%. That extract was submitted to a new ultrafiltration, however with a membrane 10 kDa cut-off.

The new ultrafiltration process resulted in a yield of 57.9% in the PG recovery, with concentration of 16.8 times.

The concentrated material were applied on Sephadex G-75 column, equilibrated and eluted in 40 mM pH 4.0 acetate buffer. Only one Polygalacturonase peak (PG) was observed and eluted after the higher protein peak (Fig. 2B). The PG peak, corresponding to elution volume 215 to 315 ml was applied in a Q Sepharose pH 4.0 and eluted with 8.8 column volumes. The polygalacturonase adsorbed to ionic changing was eluted with NaCl concentration around 0.5 M (Fig 3). After the sample dialysis, the SDS/PAGE of PG peak showed a protein band homogeneity with a 92.24 kDa molar mass (Fig. 4). The PG's homogeneity was confirmed by isoelectric point determination with a single band in a pI of 5.4. The PG purification process is summarized in table 1. Four steps were necessary for the polygalacturonase purification which yielded 2.9% of the enzyme.

Silva et al. (2002) compared PG production during growth of *P. viridicatum* and separated two Exo-PG fractions on Sephadex G-50 at 48 h and three Exo-PG fractions at 336 h, suggested a sequential induction of these enzyme along period of fermentation. Sequential production of pectinases have been reported by various authors for different microorganisms (Ismail, 1996).

Several PG isoforms was produced by *Penicillium frequentans* and purified. These isoforms were just one synthesized enzyme, however with varied glycosilation degrees in its structure that developed to different molar masses in the proteic structure. After the PGs treatment with (endoglucosidades) was determined that the isoforms had very close molar masses and the glycosilation degree was until 10 kDa (Chellegatti et al., 2002).

3.3. Characterization of PG

The PG showed a higher affinity for high esterified citrus pectins (5.15U ml⁻¹). The data suggest that PG is a Polymethylgalacturonase (PMG) (Fig. 5A). The polygalacturonase action on the citrus pectin with high esterified degree was also evaluated by viscosity measure in the reaction mixture. The figure 5B shows that the enzyme presented low capacity for viscosity reduction of the pectin solution, confirming its exo action. The confirmation that this PG is one

Exo-PMG was possible by its hydrolyzed product determination, by paper chromatography, which corresponded to the galacturonic acid (Fig. 6).

The effect of different ions on Exo-PMG activity was evaluated. When Cu^+ , Hg^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+} ions at 2 mM was used, a inhibition of 60% of Exo-PG activity was observed. Ions Na^+ and Ca^{2+} , at 5 and 10mM, were capable to increase the enzymatic activity in 30%, while ions such as K^+ , Ba^{2+} , Cr^{2+} , Ni^{2+} , Ag^+ , Mn^{2+} Al^{3+} , besides EDTA didn't interfered significantly on enzymatic activity (Tab. 2).

The Na^+ had been described as PMG activity inductor by Chun and Huber (1998). The presence of divalent ions as Ca^{2+} , Zn^{2+} and Mg^{2+} act directly on the pectin molecule, stabilizing the carboxil groups carried negatively and stimulating indirectly the polygalacturonases activity (Jayani et al., 2005; Prasanna et al., 2005; Pressey and Avants, 1977).

The Exo-PMG presented an optimum pH of 5.0 (Fig. 7A) and it was stable at pHs of 4.0 - 5.0. At pH 6.0 and at 7.0 – 10.0 range the PG showed 80 and 40 - 50% of its original activity, respectively.

When Exo-PMG was mixed with 10mM of Ca^{2+} , a change in the enzymatic stability was observed. The presence of this ion increased enzymes stability around 70 - 100% at 5 - 35°C. The Exo-PG in absence of the Ca^{2+} , was stable only at pH 4.0 – 5.0, while in presence of this ion was stable in a larger pH range 4.0 – 9.0 (90 - 100% of activity) (Fig. 7B).

Other pectinases with alkaline pH stability have been reported from *Bacillus sp.* and *Streptomyces sp.* showing pH stability between 2.0 - 9.0 and 3.0 - 11.0, respectively (Huang and Mahoney, 1999; Beg et al., 2000). Polygalacturonases under alkaline conditions are commercially important in the treatment of industrial wastewater containing pectinaceous material and processing and degumming of bast fibres (Kapoor et al., 2000).

The Exo-PMG presented optimal activity at 50 - 55°C (Fig. 8A). In relation to its stability to temperature variations, in substrate absence, Exo-PG showed 85-100% of the original activity at 5 - 35°C. At 40 - 70°C, the enzyme lost 55% of the initial activity. In presence of Ca^{2+} (10 mM) the PG maintained 80 - 100% of initial activity at 5 - 55°C and above 65%, when maintained at 70°C (Fig. 8B).

Exo-PMG purified from *Penicillium viridicatum* RFC3 showed very similar properties with two species of *Bacillus sp.* and *Penicillium frequentans* strain

that showed stability at pH 7 - 12 at 50°C (Kapoor et al., 2000; Kobayashi et al., 2001; Pietro and Roncero, 1996). In relation to the pH and temperature the Exo-PG presented similar values those obtained for PG from *Penicillium frequentans* (5.0 and 50°C), *Saccharomyces cerevisiae* (5.5 and 50°C), *Aspergillus awamori* (5.0 and 50°C), *Thermococcus aurantiacus* (5.0 and 60°C) (Jayani et al., 2005; Singh et al., 1999; Kobayashi et al., 2001; Pietro and Roncero, 1996).

The Exo-PMG was maintained at 60°C / 1 h (samples taken to each 5 min) in presence and absence of Ca²⁺. In absence of this ion, the enzyme maintained 50% of its activity for 25 min. In presence of Ca²⁺, the enzyme half-life increased to 37 min (Fig. 9). According Hernandez et al. (2006), Ca²⁺ protect the enzymes against thermal denaturation and play a vital role in maintaining the active configuration of the enzyme at high temperatures.

The values of half-life time of PMG from *Penicillium viridicatum* was higher than described by Shanley et al. (1993) for the three polygalacturonases purified from *Penicillium pinophilum*. The half-life for PGI was 10.6 min, 16.5 min for PGII and 9.5 min for PGIII. Nevertheless, the PG from *Acrophialophora nainiana* purified by Celestino et al. (2006) presented a half-life of 20min at 60°C and 3min at 70°C.

The Exo-PMG affinity on citrus pectin (92% esterification) was determined by the Lineweaver-Burk plot. In Ca²⁺ presence, the substrate affinity increased, with K_m ranged from 1.30 to 1.16 mg ml⁻¹. The same profile was observed in relation to the V_{max} in presence this ion, which values increased from 1.76 to 2.07 μmol min⁻¹mg⁻¹ (Fig. 10).

Others purified Exo-PGs have showed differentiated values in their kinetic parameters, wich range from 0,11 mg ml⁻¹ to 4.47 mg ml⁻¹ for K_m and 1.68 μmol min⁻¹mg⁻¹ to 1100 μmol min⁻¹mg⁻¹ to V_{max} (Martel et al., 1998; Corredig et al., 2000; Gillespie et al., 1990; Singh and Rao, 2002; Chellegatti et al., 2002; Cabanne and Doneche, 2002)

4. Conclusions

The PG purified from *Penicillium viridicatum* RFC3 showed to be an Exo-PMG and have a molar mass at 92.24 kDa. The Ca²⁺ presence influenced the

enzyme stability at alkaline pH values and temperature above 60°C. The presence of the ion increased the affinity of the enzyme to substrate.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

5. References

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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 808-814.

Alkorta I., Garbisu, C., Llama M.J., Serra J.L. 1998. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Proc. Biochem.* 33, 21-28.

Asaff, A., Cerda-Garcia-Rojas, C.M., Viniegra-Gonzalez, G., De La Torre, M., 2006. Carbon distribution and redirection of metabolism in *Paecilomyces fumosoroseus* during solid-state and liquid fermentation. *Proc. Biochem.*, 41, 6, 1303-1310.

Beg, Q.K., Bhushan, B., Kapoor, M., Hoondal., G.S., 2000. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces sp. QG-11-3*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 396-402.

Blanco, P., Sieiro, C., Villa, T.S. 1999. Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 175, 1-9.

Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brencic, A., Winans, S.C. 2005. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 155–194.

Cabane, C., Doneche, B., 2002. Purification and characterization of two isozymes of polygalacturonase from *Botrytis cinerea*. Effect of calcium ions on polygalacturonase activity. *Microbiol. Res.* 157, 183-189.

Celestino, S. M. C., Freitas, S. M., Medrano, F. J., Valle de Sousa, M., Filho, E. X. F., 2006. Purification and characterization of a novel pectinase from

Acrophialophora nainiana with emphasis on its physicochemical properties. J. Biotech., in press.

Chellegatti, M. A. S. C., Fonseca, M. J. V., Said, S., 2002. Purification and partial characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium frequentans*. Microbiol. Res., 157, 19-24.

Chun, J.P., Huber, D.J. 1998. Polygalacturonase-Mediated Solubilization and Depolymerization of Pectic Polymers in Tomato Fruit Cell Walls Regulation by pH and Ionic Conditions. Plant Physiol. 117, 1293–1299.

Corredig, M., Kerr, W., Wicker, L., 2000. Separation of thermostable pectinmethylsterase from marsh grapefruit pulp. J. Agric. Food Chem. 48, 4918-4823.

Cotton, P., Kasza, Z., Bruel, C., Rasclé, C., Fe'vre, M., 2003. Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. FEMS Microbiol. Lett. 227, 163-169.

Dennison, S.H., 2000. pH regulation of gene expression in fungi. Fungal Gen. Biol. 29, 61–71.

Devi N.A., Rao A.G.A., 1996. Fractionation, purification, and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. Enz. Microbiol. Technol. 18, 59-65.

Gillespie, A.M., Cook, K., Coughlan, M. P. 1990. Characterization of an endopolygalacturonase produced by solid-state cultures of the aerobic fungus *Penicillium capsulatum*. J. Biotech. 13, 279-292.

Hang, Y.D., Woodanms, E.E., 1994. Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. Lebensm. Wiss. U. Techno., 27, 194-196.

Hernandez, M. S., Rodriguez, M.R., Guerra, N.P., Roses, R.P., 2006. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. J. Food Eng. 73, 93-100.

Horikoshi, K., 1990. Enzymes from alkalophiles. In: Fogarty, W.M., Kelly, C.T. (eds) Microbial enzymes and biotechnology, 2nd edn. Elsevier, Ireland, pp 275–295.

Huang, L.K., Mahoney, R.R., 1999. Purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. J. Appl. Microbiol., 86, 145-156,.

Ismail, A.S., 1996. Utilization of orange peels for the production of multi-enzyme complexes by some fungal strains. *Process Biochem.*, 1, 645-650.

Jayani, R. S., Saxena, S., Gupta, R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Proc. Biochem., 40, 2931-2944.

- 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*. Proc. Biochem., 36, 467-473,.
- Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R., 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Biores. Technol. 77, 215-227.
- Koboyashi T, Higaki N, Yajima N, Suzumatsu A, Haghihara H, Kawai S, 2001. Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. Bios. Biotechnol. Biochem. 65, 842–847.
- Laemmli, U., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.
- Maldonado, M. C., Strasser De Saad, A. M., 1998. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. J. Industr. Microbiol. Biotechnol. 20, 34-38.
- Martel, M.B., Letoublon, R., Fevre, M., 1998. Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted the early stages of saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. FEMS Microbiol. Lett. 158, 133-138.
- Martins E.S., Silva D., Da Silva R., Gomes E., 2002. Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. Proc. Biochem. 37, 49-954.
- Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153, 375-380.
- Nighojkar, S., Phanse, Y., Sinha, D., Nighojkar, A., Kumar, A., 2006. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. Proc. Biochem., 41, 1136-1140.
- Niture S.K., Pant A., 2004. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. Microbiol.Res.159, 305-314.
- Pietro A.D., Roncero M.I.G., 1996. Purification and characterization of an exopolygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. FEMS Microbiol. Lett.145, 295–299.
- Prasanna, V., Prabha, T.N., Tharanathan, R.N. 2005. Multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L.cv Alphonso)fruit. Food Chem. (In press).
- Pressey, R., Avants, J.K., 1977. Occurrence and Properties of Polygalacturonase in Avena and Other Plants. Plant Physiol. 60, 548-553.
- Rollins, J.A., Dickman, M.B., 2001. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a *pacC/RIM1* Homolog. Applied and Environmental Microbiology,. 75–81.

Sato, K., Sudo, S. 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. 1999.

Serrat, M., Bermudez, R. C., Villa, T. G., 2002. Production, purification and characterization of a polygalacturonase from a new strain of *Kluyveromyces marxianus* isolated from coffee wet-processing wastewater. Appl. Biochem. Biotechnol., 97, 193-208.

Shanley, N. A., Van Den Broek, L. A. M, Voragen, A. G. J., Coughlan, M. P., 1993. Physicochemical and catalytic properties of three endopolygalacturonases from *Penicillium pinophilum*. J. Biotech. 28, 199-218 .

Silva, D., 2003. Estudo da produção de pectinases por *Penicillium viridicatum* RFC3 através de fermentação semi-sólida de resíduos agrícolas, São José do Rio Preto, 198 p. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP, Universidade Estadual Paulista.

Silva, D., Martins E.S., Da Silva R., Gomes E., 2002. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. Braz. J. Microbiol. 33, 318-324.

Silva, D., Tokuioshi, K., Martins, E. S., Da Silva, R., Gomes, E., 2005. Production of pectinase by solid state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. Proc. Biochem., 40, 8, 2885-2889.

Singh S.A., Plattner H., Diekmann H., 1999. Exopolygalacturonate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp. Enz. Microb.Technol. 25, 420-425.

Singh, S.A., Rao, A.G.A., 2002. A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. Biotechnol. Appl Biochem. 35; 115-123.

Solís-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniegra-González, G., Gutiérrez-Rojas, M., 1993. Effects of different carbon sources on the syntesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 39,36-41.

Somogyi, M., 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195, 19-23.

Tanabe, H., Kobayashi, Y., Akamatsu, T., 1988. Pretreatment of pectic waste water with pectate lyase from an alkalophilic *Bacillus* sp. Agric. Biol. Chem. 52, 1853–1856.

Tanabe, H., Yoshihara, Y., Tamura, K., Kobayashi, Y., Akamatsu, T., 1987. Pretreatment of pectic wastewater from orange canning process by an alkalophilic *Bacillus* sp. J. Ferment. Technol. 65, 243–246.

Teixeira, M.F.S., Lima Filho, J.L., Duran, N., 2000. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. Braz. J. Microbiol., 31, 286-290.

Yakoby, N., Kobiler, I., Dinoor, A., Prusky, D., 2000. pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. Appl. Environ. Microbiol., 66, 3, 1026-1030.

Tab. 1
Summary of purification of polygalacturonase by *Penicillium viridicatum*
RFC3

Step	Volume (ml)	PG (U ml ⁻¹)	Protein (mg ml ⁻¹)	U _{total}	S.A.* (mg ml ⁻¹)	Yeld (%)	Fold purification
Crude Enzyme	1300	3.82	0.078	4966	48.97	100	-
Ultrafiltration - 50KDa	148	21.6	0.44	3192.4	49.0	64.3	5.3
Ultrafiltration II – 10KDa	45	63.9	0.72	2875.5	88.8	57.9	9.6
Sephadex G75	40	63.9	0.72	2556.0	88.8	51.5	9.6
Fraction I G75	198	5.1	0.026	1003.9	195.0	20.2	21.2
Q Sepharose	195	5.1	0.026	988.7	195.0	19.9	21.2
Fraction I Q Sepharose.	35	4.9	0.014	169.8	346.4	3.4	37.7

* S.A. (Specific Activity)

Tab. 2
Effect of some metal ions on the PG activity

	Ion Concentration		
	2mM	5mM	10mM
Control	100	100	100
Al ³⁺	67	90	99
Fe ³⁺	43	nd	N dtm
Cr ³⁺	60	93	83
Zn ²⁺	3	nd	N dtm
Hg ²⁺	0	nd	N dtm
Mn ²⁺	110	93	90
Mg ²⁺	27	nd	N dtm
Cu ²⁺	33	nd	N dtm
Ca ²⁺	110	130	107
Co ²⁺	107	100	93
Na ⁺	103	107	83
Ag ⁺	87	93	90
NaCl	123	107	98
K ⁺	63	77	84
Ba ²⁺	90	90	20
Ni ²⁺	63	78	81
EDTA	93	83	83

N dtm – effect on activity not determined

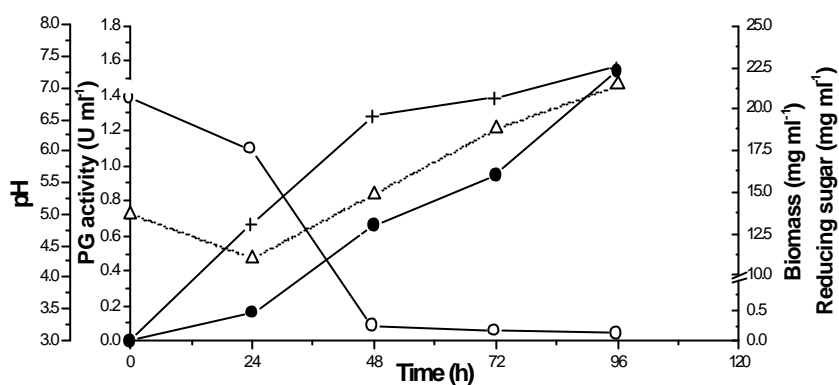


Fig. 1: Production of PG by *P. viridicatum* in submerged fermentation with orange bagasse 3% and citrus pectin. PG (-?-), Reducing sugars (-?-); pH (·-·-·) and biomass (-+-).

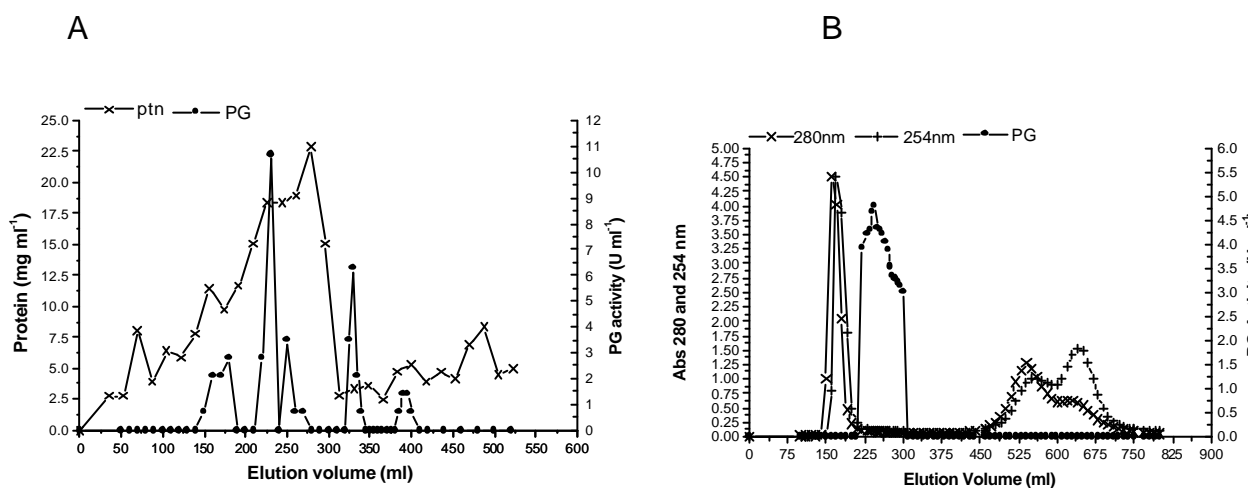


Fig. 2: Gel filtration chromatography of PG on Sephadex G-75 (2.5 x 90 cm) equilibrated with 40 mmol l⁻¹ acetate buffer, pH 4.0. (A) crude extract concentrated with ultrafiltration 10 kDa cut off, (B) crude extract after ultrafiltration with 50 and 10 kDa cut off.

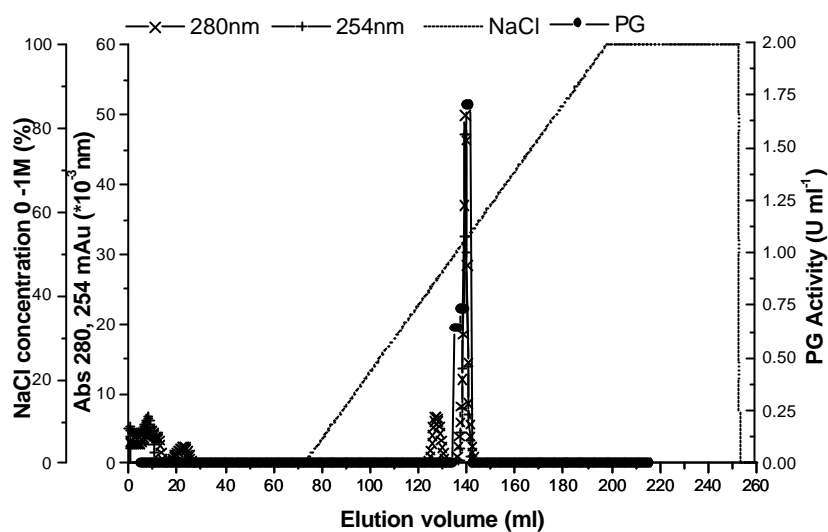


Fig. 3: Ion-exchange chromatography of PG on Q Sepharose (1 x 30 cm) equilibrated with 40 mmol l⁻¹ acetate buffer, pH 4.0.

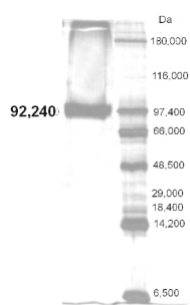


Fig. 4: SDS-PAGE of purified PG from ion-exchange chromatography (Q Sepharose).

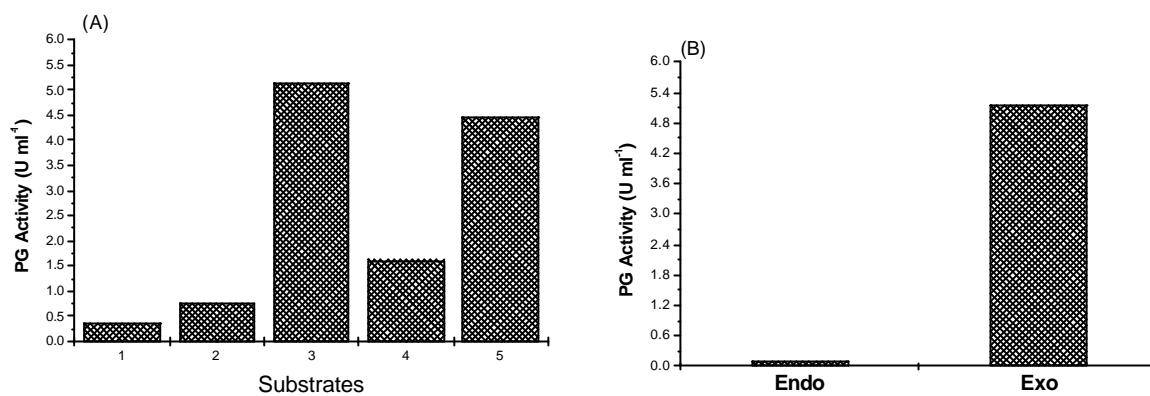


Fig. 5: PG Characteristics: (A) Substrate specificity: 1. Poligalacturonic acid; 2. citrus pectin (26% esterified); 3. citrus pectin (92% esterified); 4. apple pectin (high methoxylation); 5. commercial citrus pectin (87% esterified); **(B)** Mode of action of PG (endo and exo activity).

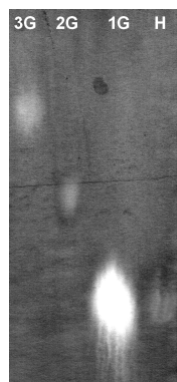


Fig. 6: Hydrolyse products of PG. 3G (trigalacturonic acid), 2G (digalacturonic acid), 1G (galacturonic acid), H (enzymatic hydrolysed).

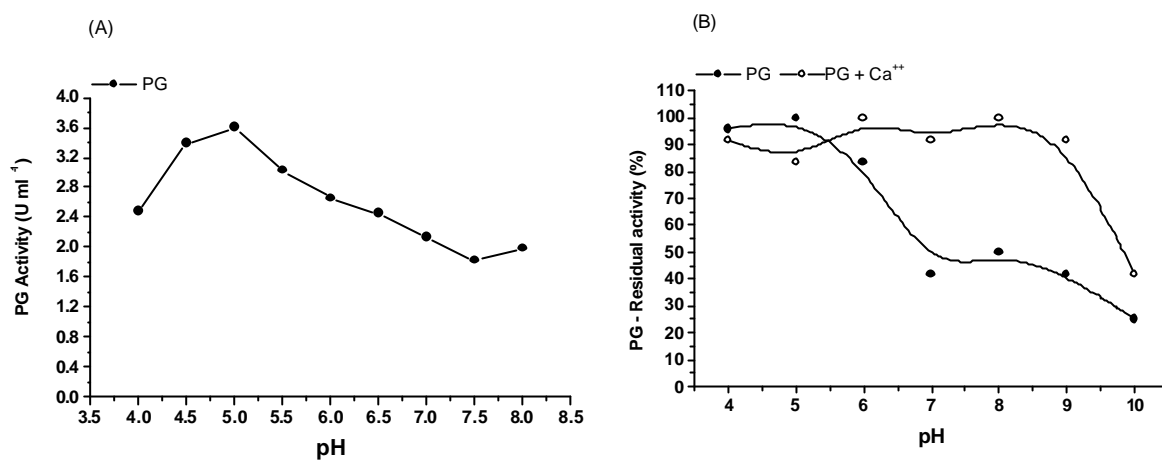


Fig. 7: (A) Effect of pH on activity of Exo-PG; (B) Effect of pH on the stability of Exo-PG.

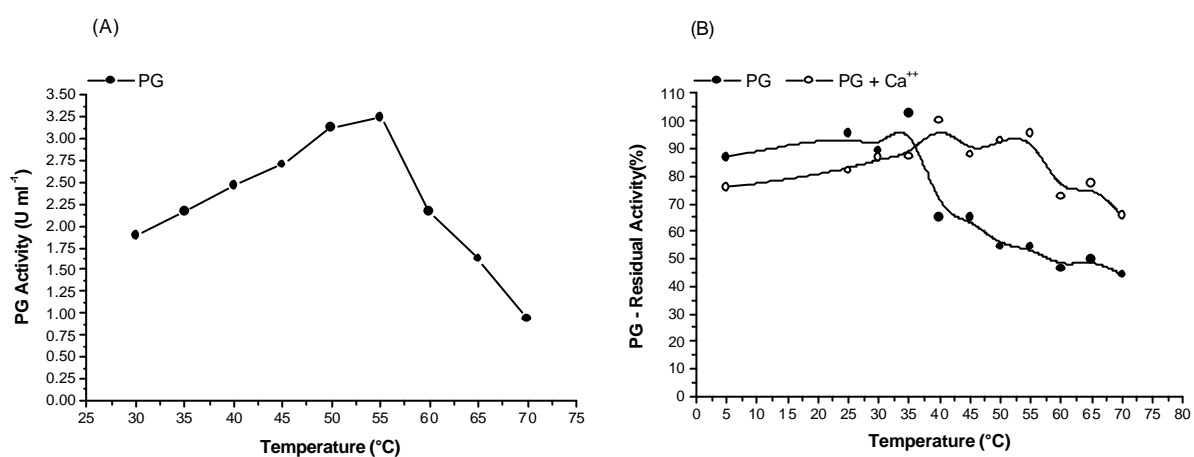


Fig. 8: (A) Effect of Temperature on activity of Exo-PG; (B) Effect of temperature on the stability of Exo-PG.

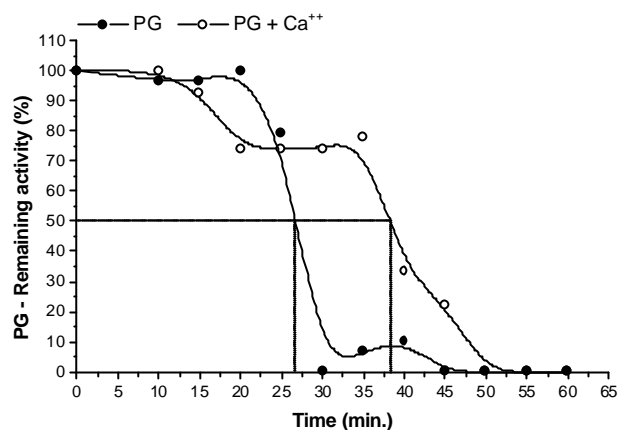


Fig. 9: “Half-life” of Exo-PG (60°C / 1 h).

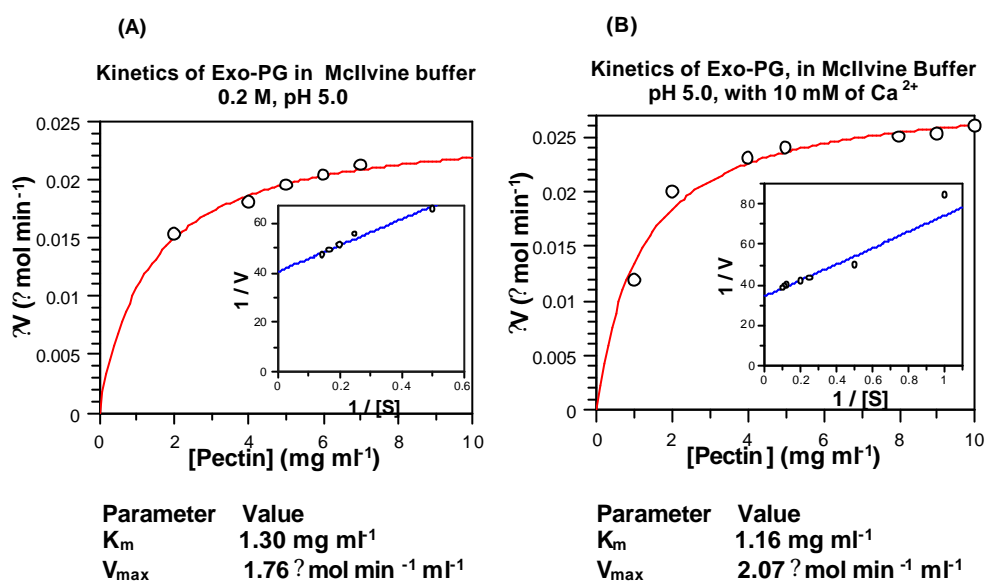


Fig 10: Kinetic parameters of purified Exo-PG on citrus pectin (92% esterified) (A), with Ca²⁺ (B).

VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos no presente trabalho indicam que o tipo de processo fermentativo empregado (FES e FSM) para a produção de poligalacturonases pelo fungo *Penicillium viridicatum* RFC3 resultou em diferenças na produção dessas enzimas obtidas quanto ao número de isoformas.

O processo de purificação de uma enzima torna-se muito dificultado devido à essa quantidade de isoformas o que nos levou a adotar diferentes estratégias de purificação, impossibilitando um estudo maior sobre uma possível PG produzida em ambos os processos fermentativos.

Porém, a purificação de duas enzimas muito diferentes quanto às características como massa molar, pH, temperatura, e principalmente a estabilidade evidenciou que o microrganismo estudado apresenta características típicas de mesófilos, que por produzirem várias isoformas da mesma enzima, tem uma maior facilidade de adaptação ambiental, permitindo um maior sucesso na colonização de diferentes ambientes degradando uma grande variedade de substâncias pécicas, ao contrário de outros microrganismos, que só sintetizam uma isoforma enzimática.

Logo, os resultados obtidos no presente trabalho possibilitam a realização de alguns estudos posteriores, como um estudo mais aprofundado quanto a termoestabilidade das enzimas purificadas, além da purificação e caracterização das outras isoformas e seu potencial na aplicação destas enzimas na indústria de sucos e têxtil.

Contudo, conhecer a origem dessas isoformas é outro estudo a ser realizado, pois entender se essas diferentes enzimas são produtos de vários genes ou se são a mesma enzima, mas com modificações pós-traducionais, ou ainda um misto de ambos é o caminho para um melhor entendimento da fisiologia fúngica.

VIII. CONCLUSÕES

? Dentre os substratos testados para a produção de PG em FSM, a maior atividade foi obtida quando o fungo foi cultivado em meio com extrato do bagaço de laranja como fonte de carbono, com pH inicial 5,5 e após 96 h de cultivo seguido da água amarela com pH inicial também corrigido para 5,5 e em 96h de fermentação. Em FES a maior produção no meio de farelo de trigo e bagaço de laranja (1:1 – p/p) com 80% de umidade utilizando erlenmeyers como biorreatores, em 336h de cultivo .

? As PGs purificadas (FES e FSM) apresentaram massas molares muito distintas: 24,12 kDa e 92,24 kDa, assim como seus pontos isoelétricos que foram 6,5 e 5,4, respectivamente.

? Ambas as enzimas apresentaram preferência por pectinas de alta esterificação como a pectina de maçã (FES) e pectina de citrus (FSM).

? Ambas liberam como produtos de hidrólise o ácido galacturônico evidenciando uma ação exo .

? As duas enzimas podem ser classificadas como Exo-polimetilgalacturonases (Exo-PMG).

? As Exo-PMGs purificadas em ambos os processos fermentativos mostraram ser dependentes de íons, para manter sua estabilidade e afinidade. A Exo-PMG da FES mostrou-se dependente de Ba^{+2} enquanto a Exo-PMG da FSM mostrou-se influenciada pela presença de Ca^{+2} e Na^{+} .

? Esses íons foram capazes de aumentar a estabilidade das enzimas frente a variações de pH fazendo com que a Exo-PMG mantivesse uma maior estabilidade em condições ácidas (FES) e alcalinas (FSM). A influência do Ca^{2+} e Ba^{2+} também aumentou a termoestabilidade de ambas as Exo-PMGs purificadas, evidenciado pelo aumento da meia vida de ambas.

? O K_m das enzimas foi de 1,30 mg/mL (FSM) e 1,82 mg/mL (FES) e a V_{\max} de 1,76 $\mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg}$ (FSM) e 81 $\mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg}$ (FSS). Em presença de seus íons houve um aumento da afinidade enzimática (K_m) e do V_{\max} exceto para a enzima da FES onde o V_{\max} diminuiu para 55 $\mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg}$.

? Ambas as enzimas purificadas de processos fermentativos distintos mostraram ter também características muito distintas entre si. Características como massa molar, pI , afinidade, pH e temperatura mostraram que o *Penicillium viridicatum* RFC3 é um microrganismo capaz de produzir enzimas que atuam em diferentes condições, possuindo assim uma capacidade de adaptação a diferentes condições do ambiente. Em relação ao seu papel biotecnológico, a utilização das enzimas oriundas da FES e FSM deste microrganismo mostram-se viáveis para a aplicação na indústria de sucos, vinificação, têxtil, dentre outras.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AGUILAR, G., TREJO, B. A., GARCIA, J. M., HUITRÓN, C., Influence of pH on endo- and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. **Can. J. Microbiol.**, v.37, p.912-917, 1991.

AKIMITSU, K., ISSHIKI, A., OHTANI, K., YAMAMOTO, H., ESHEL, D., PRUSKY, D. Sugars and pH: A clue to the regulation of fungal cell wall-degrading enzymes in plants. **Phys. Mol. Plant Pathol.**, 2005 (in press).

ALAHNA, A., LLAMA, M. J., SERRA, J. L. Purification and some properties of the pectin lyase from *Penicillium italicum*. **FEBS Lett.**, v.20, n.2, p.335-340, 1991.

ALAZARD, D., RAIMBAULT, M. Comparative study of amylolytic enzyme production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state cultivation. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.12, p.113-117, 1981.

ALBERSHEIM P. Pectin lyase from fungi. **Methods Enzymol**, v.8: p.628– 31, 1966.

ALI, Z.M., CHIN, L.-H., LAZAN, H. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. **Plant Sc.**, v.167, i.2, p.317-327, 2004.

ALKORTA, I., GARBISU, C., LLAMA, M. J., SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n^o1, p. 21-28, 1998.

ALMEIDA, M.S., KURTENBACH, E. Como purificar proteínas? **Biotec. Ciênc. Des.**, n.24, p.30-37, 2002.

ASAFF, A., CERDA-GARCIA-ROJAS, C. M., VINIEGRA-GONZALES, G., DE LA TORRE, M. Carbon distribution and redirection of metabolism in

Paecilomyces fumosoroseus during solid-state and liquid fermentation. **Proc. Biochem.**, v.41, i.6, p.1303-1310, 2006.

BAJRACHARYA, R., MUDGETT, R. E. Effects of controlled gas environments in solid substrate fermentations of rice. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 22, p. 2219-2235, 1980.

BAKER, R.A., WICKER, L. Current and potential application of enzyme infusion in the food industry. **Trends Food Sci. Technol.**, v.7, p. 279– 284. 1996

BARENSE, R.I., CHELLEGATTI, M.A.S.C., FONSECA, M.J.V., SAID, S. Partial purification and characterization of exopolygalacturonase II and III of *Penicillium frequentans*. **Braz. J. Microbiol.**, v.32, p.327-330, 2001.

BARNBY F.M., MORPETH F.F., PYLE D.L., Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification and partial characterization of the enzyme. **Enz. Microbiol. Technol.**, v.12, p.891–897,1990.

BE MILLER, J. N. An introduction to pectins: Structure and properties. In: Fishman, M. L., Jem, J. J. (Eds), Chemistry and functions of pectins, ACS Symposium Series 310. American Chemical Society, Washington, D.C., 1986. (Apud) KASHYAP, D. R., VOHRA, P. K., CHOPRA, S., TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Biores. Technol.**, v. 77, p. 215-227, 2001.

BEG, Q.K., BHUSHAN, B., KAPOOR, M., HOONDAL., G.S. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces sp. QG-11-3*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, 24, 396-402, 2000.

BELDMAN, G., ROMBOUTS, F. M., VORAGEM, A. G. J., PILNIK, W. Application of cellulase and pectinase from fungal origin for the liquifaction and saccharification of biomass. **Enz. Microbiol. Biotechnol.**, v. 6, p. 503-507, 1984.

BENE, J.A.E., VINCKEN, J.P., VAN ALEBEEK, G.J.W.M. Microbial pectinases. In: Seymour, G.B., Knox, J.P. (Eds.), Pectins and their Manipulation. **Blackwell Publishing Ltd.**, Oxford, p.174-221,2002.

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

BIESEBEKE, R. RUIJTER, G, RAHARDJO, Y. S. P., HOOGSCHAGEN, M. J., HEERIKHUISEN, M., LEVIN A., VAN DRIEL, K. G. A., SCHUTYSER, A. I., DIJKSTERHUIS, J., ZHU, Y., WEBER, F. J., VOS, W. M., VAN DEN HONDEL, K. A. M. J. J., RINZEMA, A., PUNT, P. J. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations progress report on a multi-disciplinary project. **PFEMS Yeast Res.**, v.2, p.245-248, 2002.

BLANCO, P., SIEIRO, C., VILLA, T.S. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.175, p.1-9, 1999.

BOTELLA, C., DE ORY, I., WEBB, C., CANTERO, D., BALNDINO, A. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochem. Eng. J.** v.26, p.100-106, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 284-254, 1976.

BRENCIC, A., WINANS, S.C. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v.69, p.155–194, 2005.

BUSTO, M.D., GARCÍA-TRAMONTÍN, K.E., ORTEGA, N., PEREZ-MATEOS, M. Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. **Biores. Technol.**, 2005 (*in press*).

CABANNE, C., DONÈCHE, B. Purification and characterization of two isozymes of poligalacturonase from *Botrytis cinerea*. Effect of calcium ions on poligalacturonase activity. **Microbiol. Res.**, v.157, p.183-189, 2002.

CAMMAROTA, M. C., FREIRE, D.M.G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Biores. Technol.**, (*in press*), 2006.

CANTO, W. L., MENEZES, T. J. B. Produção, usos e mercado de enzimas. In: **Estudos econômicos – Alimentos processados. Ed Campinas: ITAL – Secretaria de Agricultura e Abastecimento – Coordenação de pesquisa agropecuária – ITAL**, nº29, 1995.

CASTILHO L.R, ALVES T.L.M, MEDRONHO R.A. Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. **Proc. Biochem.**, v.34: p.181–6, 1999.

CASTILHO LR, MEDRONHO RA, ALVES TLM. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresour Technol.**, v.71, p.45–50, 2000.

CELESTINO, S.M.C., MARIA DE FREITAS, S., JAVIER MEDRANO, F., VALLE DE SOUZA, M., XIMENES FERREIRA FILHO, E. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. **J. Biotechnol.**, v.123, p.33-42, 2006.

CERVONE, F., SCALA, A., SCALA, F. Polygalacturonase from *Rhizoctonia fragariae*: further characterization of two isozymes and their action towards strawberry tissue. **Phys. Plant Patol.**, v.12, p.19-26, 1978.

CHANG, H-T., OLLIS, D. F. Extracellular microbial polysaccharides: generalizd power law for biopolysaccharides solutions. **Biotechnol. Bioeng.**, XXIV, p.2309-2318, 1982.

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

CHO, S. W., LEE, S., SHIN, W. The X-ray structure of *Aspergillus aculeatus* polygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase-octagalacturonate complex. **J. Mol. Biol.**, v. 314, p. 863-878, 2001.

CHO, Y. J., HWANG, H. J., KIM, S. W., SONG, C. H., YUN, J. W. Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. **J. Biotechnol.**, v.95, p.13-23, 2002.

CHUN, J.P., HUBER, D.J., Polygalacturonase-Mediated Solubilization and Depolymerization of Pectic Polymers in Tomato Fruit Cell Walls Regulation by pH and Ionic Conditions. **Plant Physiol.**, v.117, p.1293–1299, 1998.

ÇINAR, I. Effects of cellulose and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant arotenoids. **Proc. Biochem.**, v.40, p.945-949, 2005.

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

CORDOVA, J., NEMMAUORI, M., ISMAÏL-ALAOUI, M., MORIN, A., ROUSSOS, S., RAIMBAULT, M., BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **J. Mol. Catalysis B: Enz.**, v. 5, p. 75-78, 1998.

CORREDIG, M., KERR, W., WICKER, L., Separation of thermostable pectinmethylsterase from marsh grapefruit pulp. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.4918-4823, 2000.

COTTON, P., KASZA, Z., BRUEL, C., RASCLE, C., FE'VRE, M., Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.227, p.163-169, 2003.

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

CROAK, S., CORREDIG, M., The role of pectin in orange juice stabilization: Effect of pectin methylesterase and pectinase activity on the size cloud particles. **Food Hydrocol.**, (in press), 2006.

CROTTI, L. B., JABOR, V. A. P., CHELLEGATTI, M. A. S. C., FONSECA, M. J., SAID, S. Studies of pectic enzymes produced by *Talaromyces flavus* in submerged and solid substrate cultures. **J. Basic Microbiol.**, v. 39, n4, p. 227-235, 1999.

CUI, Y. Q., van DER LANS, R. G. J. M., GIUSEPIN, M. L. F., LUYBEN, K. C. A. M. Influence of fermentation conditions and scale on the submerged

fermentation of *Aspergillus awamori*. **Enz. Microbiol. Technol.**, v.23, p.157-167, 1998.

D'OVIDIO, R., MATTEI, B., ROBERTI, S., BELLINCAMPI, D. Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. **Bioch. Biophys. Acta.**, v. 237–244, 2004.

DE GREGÓRIO A, MANDALARI G, ARENA A, NUCITA F, TRIPODO MM, LOCURTO RB. SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Biores. Technol.**, v.83, p. 89–94, 2002.

DENNISON, S.H., pH regulation of gene expression in fungi. **Fungal Gen. Biol.** V.29, p.61–71, 2000.

DESCHAMPS, F., HUET, M. C. Beta-glucosidase production in agitated solid fermentation, study of its properties. **Biotechn. Letters**, v. 6, p. 451-456, 1984.

DEVI, N. A., RAO, A. G. A. Fractionation, purification, and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. **Enz. Microbiol. Technol.**, v. 18, p.59-65, 1996.

DIAZ-GODINEZ, G., SORIANO-SANTOS, J., VINIEGRA-GONZALEZ, G. Exopectinase produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.26, p.271-275, 2001.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. Academic Press, London, 1995 (Apud) GIBBS, P. A., SEVIOUR, R. J., SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000.

EDWARDS, A. G., HO, C. S. Effects of carbon dioxide on *Penicillium chrisogenum*: an autoradiographic study. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 32, p. 1-7, 1988.

ELISASHVILI, V., PENNIKX, M., KACHLIHVILI, E., ASATIANI, M., KVESITADZE, G. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. **Enz. Microbiol. Technol.**, v.38, i.72, p.998-1004, 2006.

ESPACHS-BARROSO, A., SOLIVA-FORTUNY, R. C., MARTÍN-BELLOSO, O. A natural clouding agent from orange peels obtained using polygalacturonase and cellulose. **Food Chem.**, v. 92, i. 1, p. 55-61, 2005.

FAWOLE, O. B., ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **Int. Biodet. Degrad.**, v. 52, p. 223-227, 2003.

FONSECA, M. J. V., SAID, S. Sequential production of pectinases by *Penicillium frequentans*. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 11, p. 174-177, 1995.

FORGATY, W. M., WARD, O. P. Pectinases and pectic polyssacharides. In: Hockenhull, D. J. D. (ed) **Progress in industrial microbiology**. London: **Churchill Livingstone**, v. 13, p. 59-119, 1974.

GALLMETZER, M., BURGSTALLER, W. Efflux of organic acids in *Penicillium simplicissimum* is an energy-spilling process, adjusting the catabolic carbon flow to the nutrient supply and the activity of catabolic pathways. **Microbiol.**, v.148, p.1143-1149, 2002.

GIBBS, P. A., SEVIOUR, R. J. The production of exopolysaccharides by *Aureobasidium pullulans* in fermenters with low-shear configurations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.49, p.168-174, 1998.

GIBBS, P. A., SEVIOUR, R. J., SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000.

GILLESPIE, A.M., COOK, K., COUGHLAN, M. P. Characterization of an endopolygalacturonase produced by solid-state cultures of the aerobic fungus *Penicillium capsulatum*. **J. Biotech.** V.13, p.279-292, 1990.

GUITIÉRREZ-ROJAS, M. S., AURIAR, S., REVAH, S., BENET, J. C. (1997) A phenomenological model for solid state fermentation of fungal mycelial growth, p. 131-142. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B. K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALEZ, G. (Ed) **Advances in solid state fermentation**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. (Apud) SATO, K., SUDO, S. Small-scale solid state fermentations. Cap 5, pag 61-79. In: Demain, A. L., Davies, J. E.(ed chief), **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. ASM Press, 2 ed, Washington, D.C. 1999.

HADJ-TAIEB, N., AYADI, M., KHLIF, M., MRAD, K., HASSAIRI, I., GARGOURI, A. Fermentor production of pectinases on gruel, a local by-product and their use in olive oil extraction. **Enz. Microbial Technol.**, 2006, (In Press)

HANG, Y.D., WOODANMS, E.E. Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. **Lebensm. Wiss. U. Techno.**, v. 27, p.194-196, 1994.

HERNANDEZ, M. S., RODRIGUEZ, M.R., GUERRA, N.P., ROSES, R.P., Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. **J. Food Eng.**, v.73, p.93-100, 2006.

HESELTIME, C.W. Biotechnology report. Solid-state fermentation. **Biotechnol Bioeng.**, v.14, p.517-532, 1972

HO, C. S., SMITH, M. D. Effect of dissolved carbon dioxide on penicillin fermentations: mycelial growth and penicillin production. **Biotechnol. Bioeng.**, XXVIII, p. 668-677, 1986.

HÖLKER, U., LENS, J. Solid state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Op. Microbiol.**, v.8, i.3, p.301-306, 2005.

HOLST, O., MANELIUS, A., KRAHE, M., MÄRKL, H., RAVEN, N., SHARP, R. Thermophiles and fermentation technology. **Comparative Biochem. Physiol.**, v. 118 A, p. 415-422, 1997.

HORIKOSHI, K. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. **Agr. Biol. Chem.**, v., 36, p.285-293, 1972.

HORIKOSHI, K., 1990. Enzymes from alkalophiles. In: FOGARTY, W.M., KELLY, C.T. (eds) **Microbial enzymes and biotechnology**, 2nd edn. Elsevier, Ireland, pp 275–295.

HOURS, R. A., VOGET, C. E., ERTOLA, R. J. Some factors affecting pectinase production from apple pomace in solid-state cultures. **Biol. Wastes**, v. 24, p. 147-157, 1988.

Huang, L.K., Mahoney, R.R. Purification and characterization of an endopolygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. **J. Appl. Microbiol.**, 86, 145-156, 1999.

HUMPHREY, A. Shake flask to fermentor: what have we learned? **Biotechnol. Prog.**, v.14, p.3-7, 1998.

ISMAIL, A.S., Utilization of orange peels for the production of multi-enzyme complexes by some fungal strains. **Process Biochem.**, v.1, p.645-650, 1996.

JAMBON, M., IMBERTY, A., DELÉAGE, G., GEOURJON, C. A new bioinformatic approach to detected common 3D sites in protein structures. **Prot. Struc. Func. and Gen.**, v. 52, p. 137-145, 2003.

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

KANG, S. W., PARK, Y. S., LEE, J. S., HONG, S. I., KIM, S. W. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Biores. Technol.**, v.91, p.153-156, 2004.

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*. **Proc. Biochem.**, 36, 467-473,.

KAPOOR, M., BEG, Q.K., BHUSHAN, B., SINGH, K., DADICH, K.S., HOONDAL, G.S. Application of alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus sp. MG-cp-2* in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncia*) bast fibers. **Proc. Biochem.**, v. 36, p.803–807, 2001.

KAR, B., BANERJEE, R., BHATTACHARYYA, B. C. Biotransformation of tannic acid to gallic acid by solid state fermentation. In: PANDEY, A. (ed) **Advances in Biotechnology**. New Delhi: Educational Publishers, pag 67-74, 1998. (**Apud**) PANDEY, A., SOCCOL, C. R., MITCHELL, D. A. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Proc. Biochem.**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

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

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

KETSA, S., DAENGGANIT, T. Firmness and activities of polygalacturonase, pectinesterase, β -galactosidase and cellulase in ripening durian harvested at different stages of maturity. **Scient. Horticul.**, v. 80, p. 181-188, 1999.

KHANAHMADI, M., MITCHEL, D. A., BEHESHTI, M., ROOSTAAZAD, R., SÁNCHEZ, L. R. Continuous solid-state fermentation affected by substrate flow pattern. **Chem. Eng. Science**, v.61, i.8, p.2675-2687, 2006.

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

KOBOYASHI T, HIGAKI N, YAJIMA N, SUZUMATSU A, HAGHIHARA H, KAWAI S, . Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of Bacillus. **Biosc. Biotechnol. Biochem.**, v.65, p.842–847, 2001.

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

LANG, C., DÖRNENBURG, H., Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.53, p.366-375, 2000.

LEE, W.C., YUSOF, S., HAMID, N.S.A., BAHARIN, B.S. Optimizing conditions for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). **J. Food Eng.**, v.73, p.55-63, 2006.

LINN, S. Strategies and considerations for protein purification. Cap.2, p.9-19 (in) **Guide to protein purification**. Deutscher, M. P. (ed) **Meth. Enzymol.**, v.182, 1990.

LONSANE, B. K., GHILDYAL, N. P., RAMAKRISHNA, S. V. Engineering aspects of pectolytic solid state fermentation. **Enz. Microbiol. Technol.**, v. 7, p. 258-265, 1985.

LOSONCZI, A., CSISZÁR, E., SZAKÁCS, G., BEZÚR, L. Role of the EDTA Chelating Agent in Bioscouring of Cotton. **Textile Res. J.**, v.75, i.5, p.411–417, 2005.

LOUW, C., LA GRANGE, D., PRETORIUS, I.S., VAN RENSBURG, P. The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavour. **J. Biotechnol.**, (in press), 2006.

MACMILLAN, J. D., SHEIMAN, M. I. Pectic enzymes. In: Whitaker, J. R. (ed) **Food related enzymes. Washington: ACS**, p. 101-130, 1974.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. cap.5, p.96-101. (in) **Microbiologia de Brock**. Kiaw, C. M. (trad.), São Paulo, Prentice Hall, 2004

MAHMOOD, A.U., GREENMAN, J., SCRAGG, A.H. Orange and potato peel extracts: analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. **Enz. Microbiol. Technol.**, v.22, p.130-7, 1998.

MAKAGIANSAR, H. Y., AYAZI SHAMLOU, P., THOMAS, C. R., LILLY, M. D. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. **Bioproc. Eng.**, v.9, p.83-90, 1993.

MALDONADO, M. C., STRASSER DE SAAD, A. M. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. **J. Industr. Microbiol. Biotechnol.**, v.20, p.34-38, 1998.

MARKOVIC, O., JANECEK, S. Pectin degrading glycoside hydrolases of family 28: sequence-structural features, specificities and evolution. **Protein Eng.**, v. 14, p. 615-631, 2001.

MARTEL, M.B., LETOUBLON, R., FEVRE, M., Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted the early stages of saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiol. Lett.** V.158, p.133-138, 1998.

MARTINS. 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.

MASOUD, W., KALTOFT, C.H. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. **Int. J. Food Microbiol.**, v.106, i.2, p.229-234, 2006.

McINTYRE, M., McNEIL, B. Morphogenic and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi in submerged cultivation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, p.291-298, 1998.

McNEIL, B., HARVEY, L.M. Viscous fermentation products. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v.13, p.275-304, 1993.

METZ, B., KOSSEN, N. W. F., van SUIJDAN, J. C. The rheology of moulds suspension. **Adv. Biochem. Eng.**, v. 11, p.103-156, 1979. (Apud) GIBBS, P. A., SEVIOUR, R. J. SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v.20, n.1, p. 17-48, 2000.

MILES, E. A., TRINCI, A. P. J. Effect of pH and temperature on morphology batch and chemostat cultures of *Penicillium chrysogenum*. **Trans. Br. Mycol.**, v.81, p. 193-200, 1983.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 6-428, 1959.

MITCHELL, D. A. Produção de enzimas em fermentação em estado sólido e a sua recuperação (In) **III Curso Fermentação Semi-sólida na obtenção de bioprodutos** (cd), Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, S.P., 2002

MITCHELL, D. A., BEROVIC, M., KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MITCHELL, D. A., LONSANE, B. K. **Definition, Characteristics and Potential**, cap I, p. 1-16. In: Doelle, H. W., Mitchell, D. A., Rolz, C. E. (ed.) **Solid Substrate Cultivation**, Elsevier Science Publishers Ltd, London, 463p, 1992.

MOO-YOUNG, M., MOREIRA, A. R., TERGERDY, R. P. Principles of solid substrate fermentation. In: Filamentous Fungi, v. 4, ed J. F. Smith, D. R. Berry, B. Kristiansen. Edward Arnold, London, p. 117-144, 1983 (**Apud**) MITCHELL, D. A., LONSANE, B. K. **Definition, Characteristics and Potential**, cap I, p. 1-16. In: DOELLE, H. W., MITCHELL, D. A., ROLZ, C. E. (ed.) **Solid Substrate Cultivation**, Elsevier Science Publishers Ltd, London, 463p, 1992.

NAESSENS, M., VANDAMME, E.J. Multiple forms of microbial enzymes. **Biotechnol. Lett.**, v.25, p.1119-1124, 2003.

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

NELSON, N., A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. **J. Biol. Chem.** V.153, p.375-380, 1944.

NIGHOJKAR, S., PHANSE, Y., SINHA, D., NIGHOJKAR, A., KUMAR, A., Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. **Proc. Biochem.**, v.41, p.1136-1140, 2006.

NISHIO, N., NAGAI, S., Single cell protein production from mandarin orange peel. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.11, p.156-160, 1981.

NITURE, S. K., PANT, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. **Microbiol. Res.**, v.154, p.305-314, 2004.

NOUT, M.J.R., ROMBOUTS, F.M. Recent developments in tempe research. **J Appl Bacteriol**, v.69, p.609-33, 1990.

OLSSON, L., CHRISTENSEN, T. M. I. E., HANSEN, K. P., PALMQVIST, E. A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enz. Microbiol. Technol.**, v. 33, p. 612-619, 2003.

OOIJKAAS, L. P., 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.**, v. 18, p. 356-360, 2000.

OOSTERHUIS, N.M.G., KOSSEN, N.W.F. Dissolved oxygen concentration profiles in a production-scale bioreactor. **Biotechnol. Bioeng.**, XXVI, p.546-550, 1984.

OSVIK, E. S., KRISTIANSEN, B. Influence of oxygen tension, biomass concentration, and specific growth rate on the rheological properties of a filamentous fermentation broth. **Biotechnol. Bioeng.**, v.40, p.1293-1299, 1993.

PANDA, T., NAIR, S. R., PREM KUMAR, M. Regulation of synthesis of pectolytic enzymes of *Aspergillus niger*. **Enz. Microbiol. Tech.**, 2004 (in press).

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v. 3636, p. 1-4, 2002

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., BRAND, D., MOHAN R., ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses **Biochem. Eng. J.**, v.6, i.2, p.153-162, 2000a.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P., SOCCOL, V. T., VANDENBERGHE, L. P. S., MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Biores. Technol.**, v. 74, p. 81-87, 2000b.

PANDEY, A., Solid state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v.13, p.81-84, 2003.

PATIL, S.R., DAYANAND, A. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseed sunflower head in submerged and solid-state conditions. **Biores. Technol.**, (in press), 2005.

PETRUCIOLI, M, FENICE, M. PICCIONI, P., FEDERICI, F. Effect of stirrer speed and buffering agents on the production of glucose oxidase and catalase by *Penicillium variabile* (P16) in benchtop bioreactor. **Enz. Microbiol. Technol.**, v.17, p.336-339, 1995.

PIETRO A.D., RONCERO M.I.G. Purification and characterization of an exopolygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici. **FEMS Microbiol Lett.**, v.145, p.295-298, 1996.

PIFFERI, P. G., BUSKA, G., MANENTI, I., LO PRETI, A., SPAGNA, G. Immobilization of pectinesterase on γ -alumina for the treatment of juices. **Belgian J. Food Chem. Biotechnol.**, v. 44, p. 173-182, 1989.

PILNIK, W., ROMBOUTS, F. M. Pectic enzymes. In: Birch, G. C., Blakebrough, N., Parker, K. J. (ed) **Enzymes in food processing**. London: Applied Science Publishers, p. 105-128, 1981.

PIRT, S., CALLOW, D. S. Continuous-flow culture of the filamentous mould *Penicillium chrysogenum* and the control of this morphology. **Nature**, v. 184, p. 307-310, 1959. (Apud) GIBBS, P. A., SEVIOUR, R. J. SCHMID, F. Growth of

filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Rev. Biotechnol.**, v.20, n.1, p. 17-48, 2000.

PORCEL, E.M.R., CASAS LÓPEZ, J.L., SÁNCHEZ PÉREZ, J.A., FERNÁNDEZ SEVILLA, J.M., CHISTI, Y. Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*. **Biochem. Eng. J.**, v.26, p.139-144, 2005.

PRASANNA, V., PRABHA, T.N., THARANATHAN, R.N. Multiple forms of polygalacturonase from mango (*Mangifera indica* L.cv Alphonso)fruit. **Food Chem.** (In press), 2005.

PRESSEY, R., AVANTS, J.K., Occurrence and Properties of Polygalacturonase in Avena and Other Plants. **Plant Physiol.**, v.60, p.548-553, 1977.

RAGHAVARAO, K.S.M.S., RANGANATHAN, T.V., KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v.13, p.127-135, 2003.

RAHARDJO, Y.S.P., SIE, S., WEBER, F.J., TRAMPER, J., RINZEMA, A. Effect of low oxygen concentrations on growth and α -amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. **Biomol. Eng.**, v.21, p.163-172, 2005.

RAIMBAULT, M., ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.9, p.199-209, 1980.

RHA, E.; PARK, H. J.; KIM, M. O.; CHUNG, Y. R.; LEE, C.; KIM, J. W. Expression of exo-polygalacturonases in *Botrytis cinera*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, p. 105-109, 2001.

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

ROLDÁN, A., PALACIOS, V., PEÑATE, X., BENITEZ, T., PÉREZ, L., Use of *Trichoderma* enzymatic extracts on vinification of *Palomino* finograpes in the sherry region. **J. Food Eng.**, v.75p. 375-382, 2006.

ROLLINS, J.A., DICKMAN, M.B., pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: Identification of a *pacC/RIM1* Homolog. **Appl. Environ. Microbiol.**, p.75–81, 2001

ROMBOUTS FM, PILNIK W. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. **Proc. Biochem.**, v.18, p.9–13, 1978.

ROMBOUTS, F.M., PILNIK, W. **Pectic enzymes**. In. Economic Microbiology, ed. ROSE, A.H., Academic Press, London, v.5, p.227-282, 1980 (**Apud**) DOELLE, H. W., MITCHELL, D. A., ROLZ, C. E. (ed.) **Solid Substrate Cultivation**, Elsevier Science Publishers Ltd, London, 463p, 1992.

RUNCO, R., NAVARRO, A. R., MALDONADO, M. Regulation of polygalacturonase by *Aspergillus niger*. **W. J. Microbiol. Biotechnol.**, v.17, p.487-491, 2001.

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

SAKAMOTO, T., BONNIN, E., QUEMENER, B., THIBAUT, J.-F. Purification and characterization of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. **Biochem. Et Biophysic. Acta.**,v. 1572, p.10-18, 2002.

SANGSURASAK, P., NOPHARATANA, M., MITCHELL, D. A. Mathematical modeling of the growth of filamentous fungi in solid state fermentation. **J. Sc. Ind. Res.**, v. 55, p. 333-342, 1996.

SANT'ANNA JR, G. L. Produção de enzimas microbianas. Cap 14. p.356-357 (in) **Biotecnologia Industrial, Processos Fermentativos e Enzimáticos**. V.3. Lima, V. A. (coord), Edgard Blücher LTDA, 2001._____

SANTEN, Y. V.; BENEN, A. E.; SCHROTER, K.; HALK, K. H.; ARMAND, S.; VISSER, J.; DIJKSTRA, B. W. 1.68- Å Crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 30474–30480, 1999.

SARRETTE, M., NOUT, M. J. R., GERVAIS, P., ROMBOUTS, F. M. Effect of water activity on production and activity of *Rhizopus oligosporus* polysaccharides. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.37, n.4, p. 420-425, 1992.

SATO, K., SUDO, S. 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. 1999.

SCERRA, V., CARIDI, A., FOTI, F., SINATRA, M.C., Influence of dairy *Penicillium spp.* on nutrient content of citrus fruit peel. **Animal Feed Sc. Technol.**, v.78, p.169-176, 1999.

SERRA, J. L., ALKORTA, I., LLAMA, M. J., ALAÑA, A. Aplicacion industrial de los enzimas pécticos. Produccion, purificacion, imovilizacion y algunas propiedades de la pectina liasa de *Penicillium italicum*. **Alim. Eq. Tecnol.**, v. 11, p. 127-134, 1992.

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

SHAH, M.P., REDDY, G. V., Banerjee, R., Ravindra Babu, P., Kothari, I.L. Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using

two lignocellulolytic fungi (*Phylosticta* spp. MPS-001 and *Aspergillus* spp. MPS-002). **Proc. Biochem.**, v.40, p.445-451, 2005.

SHANLEY, N. A., VAN DEN BROEK, L. A. M, VORAGEN, A. G. J., COUGHLAN, M. P., Physicochemical and catalytic properties of three endopolygalacturonases from *Penicillium pinophilum*. **J. Biotech.** V.28, p.199-218, 1993.

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

SHIMIZU, T.; NAKATSU, K.; MIYAIRI, K.; OKUNO, T.; KATO, H. Active site architecture of endopolygalacturonase I from *Stereum purpureum* revealed by crystal structures in native and ligand-bound forms at atomic resolution. **Biochem.**, v. 41, p. 6651-6659, 2002.

SHU, C-H., LUNG, M. Y. effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorate* in batch cultures. **Proc. Biochem.**, v.39, p.931-937, 2004.

SILVA, D. **Estudo da produção de pectinases por *Penicillium viridicatum* RFC3 através de fermentação semi-sólida de resíduos agrícolas**, São José do Rio Preto, 2003. 198 p. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas (IBILCE), UNESP, Universidade Estadual Paulista.

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

SILVA, D., TOKUIOSHI, K., MARTINS, E. S., DA SILVA, R., GOMES, E. Production of pectinase by solid state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Proc. Biochem.**, v.40, i. 8, p. 2885-2889, 2005.

SIN, H.N., YUSOF, S., SHEIKH ABDUL HAMID, N., ABD. RAHMAN, R. Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. **J. Food Eng.**, v. 73, i. 4, p. 313-319, 2006,

SINGH S.A., PLATTNER H., DIEKMANN H., Exopolygalacturonate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp. **Enz. Microb. Technol.** v.25, p.420-425, 1999.

SINGH, K., PUNIYA, K., SINGH, S. Biotransformation of crop residues into animal feed by solid state fermentation. **J. Sc. Ind. Res.**, v. 55, p. 472-478, 1999.

SINGH, S. A., RAO, A.G. A. A simple fractionation protocol for, and a comprehensive study of the molecular properties of two major endopolygalacturonases from *Aspergillus niger*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.35, p.115-123, 2002.

SINGH, S.A., RAMAKRISHNA, M., RAO, A.G.A., Optimization of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented broth of *Aspergillus carbonarius*. *Proc. Biochem.*, v.35, p. 411–417, 1999.

SMITH, J. E. (1978) Asexual sporulation in filamentous fungi. **In: *The Filamentous Fungi***, v.3, Develomental Mycology. P. 214-239. Smith, J. E., Berry. D. R.(eds) Edward Arnold (Publishers) Ltd., Bristol. (**Apud**) GIBBS, P. A., SEVIOUR, R. J. SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Rev. Biotechnol.**, v.20, n.1, p. 17-48, 2000.

SOARES, M., CHRISTEN, P., PANDEY, A., SOCCOL, C. R. Fruit flavor production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee rusk in solid-state fermentation. **Proc. Biochem.**, v. 35, p. 857-861, 2000.

SOLÍS-PEREIRA, S., FAVELA-TORRES, E., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G., GUTIÉRREZ-ROJAS, M. Effects of different carbon sources on the syntesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, p. 36-41, 1993.

SOMOGYI, M., Notes on sugar determination. **J. Biol. Chem.** V.195, p.19-23, 1952.

SONIA, K.G., CHADHA, B.S., SAINI, H.S. Sorghum straw for xylanase hyper-production by *Thermomyces lanuginosus* (D_2W_3) under solid-state fermentation. **Biores. Technol.**, v.96, p.1561-1569, 2005.

SPARRINGA RA, OWENS JD. Causes of alkalization in tempe solid substrate fermentation. **Enz. Microbiol. Technol.**, v.25 p.677–81, 1999.

TANABE, H., KOBAYASHI, Y., AKAMATSU, T., Pretreatment of pectic waste water with pectate lyase from an alkalophilic *Bacillus* sp. **Agric. Biol. Chem.** V.52, p.1853–1856, 1988.

TAVARES, V. B., SIVIERI, K., CERON, C. R., DA SILVA, R., TRABUCO, E., LOMBARDI, F. R., 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. **Quim. Nova**, v.21, n.6, p.722-725, 1998.

TEIXEIRA, M.F.S., LIMA FILHO, J.L., DURAN, N. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. **Braz. J. Microbiol.**, v.31, p.286-290, 2000.

TREVELYAN, W. E. The enrichment of cassava by moist-solids fermentation. **Trop. Sc.**, v. 16, p. 179-194, 1974.

VAN SUIJDAM, J. C., METZ, B. Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. **Biotechnol. Bioeng.**, XXIII, p. 111-148, 1981.

VANDERBERGHE, L. P. S., SOCCOL, C. R., PANDEY, A., LEBEAULT, J. M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Biores. Technol.**, v. 74, p. 175-178, 2000.

VARDAR, F., LILLY, M. D. Effect of cycling dissolved oxygen concentration on product formation in penicillin fermentations. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 14, p.203-211, 1982.

VARZAKAS, T. H., PYLE, D. L., NIRANJAM, K. (1997) Mycelial penetration and enzymic diffusion on soybean tempe, p. 59-70. In: ROUSSOS, S., LONSANE, B. K., RAIMBAULT, M., VINIEGRA-GONZALEZ, G. (Ed) **Advances in solid-state fermentation**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

VAUTARD-MEY, G., FÉVRE, M. Carbon and pH Modulate the Expression of the Fungal Glucose Repressor Encoding Genes. **Curr. Microbiol.**, v.46, p.146–150, 2003.

VERLENT, I., SMOUT, C., DUVETTER, T., HENDRICKX, M.E., VAN LOEY, A. Effect of temperature and pressure on the activity of purified tomato polygalacturonase in the presence of pectins with different patterns of methyl esterification. **Innov. F. Sc. Emerging Technol.**, v.6, p.293-303, 2005.

VILLEGAS, E., REVAH, S., AUBAGUE, S., ALCANTARA, L., AURIA, R. Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments. **Biotechnol. Adv.**, v. 11, p. 387-397, 1993.

WARD, O.P., MOO-YOUNG, M., Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharides. **CRC Crit. Rev. Biotechnol.**, v.8, p. 237–274, 1989.

WENG, X.Y., SUN, J Y. Biodegradation of free gossypol by a new strain of *Candida tropicalis* under solid state fermentation: Effects of fermentation parameters. **Proc. Biochem.**, v. 41, p.1663-1668, 2006.

WHITAKER, J. R. Microbial pectolytic enzymes. In, FORGATY, W. M., KELLY, C. T. (ed) **Microbiol Enz. Biotechnol.**, 2 ed. London: Elsevier, cap. 4, p. 133-176, 1990.

XIA L, CEN P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from xylose industry. **Proc. Biochem.**, v.34, p.909–12, 1999.

YAKOBY, N., KOBILER, I., DINOOR, A., PRUSKY, D. pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, n.3, p.1026-1030, 2000.

YAO, C., CONWAY, W.S., SAMS, C.E. Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* in apple fruit. **Phytopathology - Biochem. Cell Biol.**, v.86, n.11, p.1160-1166, 1996.

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

ZHOU, W., HOLZHAUER-RIEGER, K., DORS, M., SCHÜGERL, K. Influence of dissolved oxygen on the biosynthesis of cephalosporin. **Curr. Enz. Microb. Tech.**, v.14, p.848-854, 1992.