



Lucas Vinícius Trindade

Purificação e estudos bioquímicos de exo-poligalacturonase (pectinase) produzida pelo fungo termofílico *Rhizomucor pusillus*, em cultivo submerso e aplicação na extração de sucos de frutas e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

São José do Rio Preto
2015

Lucas Vinícius Trindade

Purificação e estudos bioquímicos de exo-poligalacturonase (pectinase) produzida pelo fungo termofílico *Rhizomucor pusillus*, em cultivo submerso e aplicação na extração de sucos de frutas e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

São José do Rio Preto
2015

Trindade, Lucas Vinícius.

Purificação e estudos bioquímicos de exo-poligalacturonase (pectinase) produzida pelo fungo termofílico *Rhizomucor pusillus*, em cultivo submerso e aplicação na extração de sucos de frutas e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar / Lucas Vinícius Trindade. -- São José do Rio Preto, 2015
56 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enzimas de fungos - Aplicações industriais. 3. Enzimas de fungos - Purificação. 4. Pectinase. 5. Fungos termofílicos. 6. Hidrólise. I. Bonilla-Rodriguez, Gustavo Orlando. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Lucas Vinícius Trindade

Purificação e estudos bioquímicos de exo-poligalacturonase (pectinase) produzida pelo fungo termofílico *Rhizomucor pusillus*, em cultivo submerso e aplicação na extração de sucos de frutas e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Marinonio Lopes Cornelio
UNESP – São José do Rio Preto

Prof.^a Dr.^a Marcia Maria de Souza Moretti
UNESP – Ilha Solteira

São José do Rio Preto

06 de março de 2015

RESUMO

As pectinases são um grupo de enzimas capazes de degradar polissacarídeos pécticos (pectinas). Estas enzimas são utilizadas na indústria de produção de sucos de frutas, vinhos, têxtil, papel, chá, óleos e etc. O presente trabalho teve por objetivo produzir, purificar e caracterizar a pectinase exo-poligacturonase (exo-PG - EC 3.2.1.67) do fun-go termofílico *Rhizomucor pusillus*. A enzima foi produzida por cultivo submerso e purificada por salting-out e cromatografia. Este método se revelou como o mais adequado empregando 95 % de sulfato de amônio, sendo que com esta técnica foi possível obter a enzima quase livre de contaminantes e com um rendimento de aproximadamente 74 %. Um passo subsequente de cromatografia de interação hidrofóbica é capaz de re-mover os contaminantes remanescentes. A enzima pura possui massa molecular ao redor de 43,5-47 kDa, pH ótimo de 4,0, temperatura ótima de 61 °C, é estável a uma faixa de pH que varia de 3,5 a 6,5, possui estabilidade térmica de 30 até 60 °C e é ati-vada na presença de Ca^{+2} . O ponto isoelétrico da exo-PG é 6,2 e estudos termodinâmicos mostraram se tratar de uma enzima termofílica, destacando seu tempo de meia-vida $t_{1/2}$ de 2.310 min., a 50 °C. O perfil da hidrólise foi analisado por eletroforese capilar e os estudos indicam que a enzima em estudo apresenta um padrão de hidrólise sequencial (exo). A identificação dos aminoácidos por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF e a comparação com bancos de dados revelou a maior identidade dos fragmentos sequenciados da exo-PG de *R. pusillus* com a enzima correspondente de *Aspergillus fumigatus*. Os testes de aplicação das enzimas do extrato bruto mostraram um aumento da extração de suco e um auxílio no processo de hidrólise, sendo que este não foi observado com a enzima pura.

Palavras-chave: Pectinase. Termofílico. Purificação.

ABSTRACT

Pectinases are a group of enzymes capable of degrading pectic polysaccharides (pec-tin). These enzymes are used in the industry for production of fruit juices, wines, tex-tiles, paper, tea, oils, etc. This study aimed to produce, purify and characterize an exo-poligacturonase (exo-PG - EC 3.2.1.67) from the thermophilic fungus Rhizomucor pu-sillus. The enzyme was produced by submerged cultivation and purified by chromatog-raphy and salting out. This has proved to be the most appropriate using 95 % ammoni-um sulfate, and with this technique it was possible to obtain the enzyme almost free of contaminants and with a yield of approximately 74 %. A subsequent step of hydropho-bic interaction chromatography is able to remove the remaining contaminants. The pure enzyme has molecular mass around 43.5-47 kDa, optimum pH of 4.0, optimum temperature of 61 °C, is stable at a pH range between 3.5 and 6.5, presents thermal stability from 30 to 60 °C and is activated in the presence Ca^{2+} . The isoelectric point of the exo-PG is 6.2 and thermodynamic studies have shown that it is a thermophilic enzyme, highlighting its half-life $t_{1/2}$ of 2,310 minutes at 50 °C. The profile of hydrolysis was ana-lyzed by capillary electrophoresis and studies indicate that the enzyme in this study has a pattern of sequential hydrolysis (exo). The identification of amino acids by mass spec-trometry MALDI-TOF and a comparison with data banks showed the highest identity of the sequenced fragments of exo-PG from R. pusillus with the corresponding enzyme from Aspergillus fumigatus. The application tests of the enzymes of the crude extract showed increased extra juice extraction and a higher yield in the hydrolysis process, but this was not observed with the pure enzyme.

Keywords: *Pectinase. Thermophilic. Purification.*

Nada em Biologia Faz Sentido Exceto à Luz da Evolução

Theodosius Dobzhansky (1900-1975)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Adão e Sandra, por todo carinho, paciência e dedicação e sobretudo pela oportunidade prosseguir nos estudos. Todo o trabalho desenvolvido durante meus anos de graduação e pós-graduação é fruto do esforço deles.

Agradeço ao meu orientador, prof. Gustavo, por toda dedicação, pelas aulas e paciência e por ser este exemplo de profissional no qual todos se espelham. Acompanhou cuidadosamente todas as etapas deste trabalho e cuja dedicação e curiosidade, imprescindível a um pesquisador, nos inspira. Sem a sua experiência este trabalho não poderia ser realizado.

Agradeço a minha co-orientadora, prof. Eleni, pela oportunidade de trabalhar neste projeto e por todas aulas da pós-graduação que foram fundamentais para embasar a discussão deste trabalho.

Agradeço aos membros do L.B.P com os quais eu convivi nestes anos, sobretudo Amanda, Rafael, Marcello, Monique, Camila, Samila, Cristian, Emily e Vanessa. Agradeço também aos membros do L.B.M.A. que me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos meus professores da graduação pelos ensinamentos e a turma 54 pelo companheirismo.

Agradeço, por fim, a algumas pessoas cuja colaboração foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho: Marcia e Olavo (pela ajuda com a hidrólise enzimática), Prof. Maria de Lourdes e Carla (pela ajuda com o zimograma), à prof. Aline (pelo auxílio nas análises do grau de esterificação das pectinas) e pelo prof. André (pelo sequenciamento e padrão hidrólise).

À CAPES pela bolsa de Mestrado e à FAPESP pelo apoio financeiro.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. BIOLOGIA DOS FUNGOS	2
2.1.1. Características gerais dos fungos	2
2.1.2. Efeito do pH no crescimento dos fungos	3
2.1.3. Efeito do oxigênio sobre o crescimento dos fungos	4
2.1.4. Efeito da temperatura no crescimento dos fungos	4
2.2. MICRORGANISMOS TERMOFÍLICOS	4
2.2.1. Ocorrência de microrganismos termofílicos	4
2.2.2. Adaptações de membranas à termofilia	5
2.2.3. Adaptações de genoma e transcriptoma à termofilia	5
2.2.4. Adaptações à termofilia ao nível do proteoma	6
2.3. ESTRUTURA BIOQUÍMICA DA PAREDE CELULAR VEGETAL	9
2.3.1. Componentes lignocelulósico e hemicelulósico da parede celular vegetal	9
2.3.1. Componentes pécticos da parede celular vegetal	10
2.4. PECTINASES	13
2.4.1. Principais pectinases e mecanismos de catálise	13
2.4.2. Principais aplicações das pectinases	14
3. JUSTIFICATIVA	16
4. OBJETIVOS	17
5. MATERIAIS E MÉTODOS	18
5.1. Obtenção e preparo do bagaço de laranja	18
5.2. Microrganismo	18
5.3. Pré-inóculo	18

5.4. Cultivo submerso (CSm)	19
5.5. Clarificação do extrato	19
5.6. Quantificação de açúcares redutores	19
5.7. Quantificação de proteínas totais	20
5.8. Análises eletroforéticas: SDS-PAGE	20
5.9. Análises eletroforéticas: Zimograma	20
5.10. Estimativa da massa molar da Exo-PG em condições nativa e des-naturante	21
5.11. Caracterização bioquímica da exo-PG presente no extrato bruto frente às variações de pH e temperatura	22
5.12. Efeito de cátions na atividade da exo-PG parcialmente purificada	22
5.13. Focalização isoeletrica (IEF)	23
5.14. Purificação da exo-PG	24
5.14.1. Precipitação salina (<i>salting-out</i>) com sulfato de amônio	24
5.14.2. Diálise	24
5.14.3. Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC)	24
5.15. Caracterização da exo-PG pura	25
5.15.1. Caracterização da exo-PG pura frente às variações de pH e temperatura	25
5.15.2. Caracterização da exo-PG pura quanto ao substrato ótimo de catálise	25
5.16. Estudo cinético da exo-PG	25
5.17. Termodinâmica da termoinativação irreversível	26
5.17.1. Caracterização quanto à temperatura ótima, cálculo de E_a e Q_{10}	26
5.17.2. Parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica irreversível	26
5.18. Sequenciamento parcial da exo-poligalacturonase purificada por espectrometria de massa	28
5.19. Identificação dos produtos da hidrólise por eletroforese capilar	28
5.20. Aplicação do extrato enzimático para a extração de sucos	28

5.21. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar	28
5.22. Determinação da composição de material lignocelulósico (lignina solúvel e insolúvel, celulose e hemicelulose) do bagaço de cana.	29
5.23. Determinação da composição de material lignocelulósico (celulose e hemicelulose)	30
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6.1. Curva de produção de exo-PG e análises eletroforéticas do extrato bruto	31
6.2. Estimativa da massa molecular da exo-PG	32
6.3. Efeito de cátions na atividade da exo-PG parcialmente purificada	34
6.4. Purificação da exo-PG	35
6.5. Caracterização bioquímica da exo-PG	37
6.6. Estudo cinético da exo-PG	40
6.7. Termodinâmica da termoinativação irreversível	40
6.8. Identificação de produtos da hidrólise por eletroforese capilar	44
6.9. Análise da exo-PG por espectrometria de massa	45
6.10. Extração de sucos de frutas	46
6.11. Determinação da composição química do bagaço e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar	47
7. CONCLUSÕES	49
8. REFERÊNCIAS	50

ABREVIATÖES

A	Adenina
APTS	Acido 1,3,6-trissulfônico 8-aminopireno
ARA-I	Arabinogalactana I
ARA-II	Arabinogalactana II
C	Citosina
Cav. N	Cavidade interior
Cav. V	Volume total
CSm	Cultivo submerso
CTBE	Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol
DE	Grau de esterificação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNS	Ácido 3,5-dinitrossalicílico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilenodiaminotetracético
Exo-PG	Exo-poligalacturonase
<i>f</i>	Furanose
FPM	Força próton-motora
G	Guanina
G1P	Glicerol-1-fosfato
G3P	Glicerol-3-fosfato
GAX	Glicuronoarabinoxilanos
HG	Homogalacturonana
HIC	Cromatografia de interação hidrofóbica
IEF	Focalização isoeétrica
K _d	Coeficiente de partição em cromatografia
k _d	Constante de primeira ordem da taxa de reação da inativação térmica

(first order rate constant of thermal inactivation)

MN	Mananas
mRNA	RNA mensageiro
<i>p</i>	Pirnose
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PDA	<i>potato dextrose agar</i>
pI	Ponto ou pH isoelétrico
RG-I	Ramnogalacturonana I
RG-II	Ramnogalacturonana II
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T	Timina
TCA	Ácido tricloroacético
tRNA	RNA transportador
XGA	Xilogalacturonana
XyG	Xiloglicano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da árvore filogenética universal, baseada em análises da subunidade 16S e 18S de rRNA, evidenciando o posicionamento dos fungos (Adaptado de Deacon, 2006).	2
Figura 2	Organização típica dos componentes da parede celular vegetal (MURPHY; McCARTHY, 2004).	10
Figura 3	Organização típica dos componentes da parede celular vegetal, evidenciando a presença de pectina na parede primária e na lamela média (Fonte: http://www.ippa.info/what_is_pectin.htm).	11
Figura 4	Representação convencional da HG, RG-I e RG-II (adaptado de Canteri et al., 2012).	12
Figura 5	Representação de uma parte da sequência principal da pectina, formada por galacturonato eventualmente metilado no carbono 6 (Fonte: http://sciexplorer.blogspot.com.br/2012/08/jam-science-first-let-me-be-clear-i-am.html)	13
Figura 6	Modo de ação das principais pectinases. (a) R = H para PG e CH ₃ para PMG; (b) PE; e (c) R = H para PGL e CH ₃ para PL. As siglas indicam os locais onde as enzimas reagem com as substâncias péc-ticas. PMG, polimetilgalacturonases; PG, poligalacturonases; PE, pectinaesterase; PL, pectina liase (PEDROLI et al., 2009).	14
Figura 7	Curva de produção de exo-PG do fungo <i>Rhizomucor pusillus</i> (três réplicas). Cada ponto representa a média de produção e a barra vertical o desvio padrão para cada tempo de fermentação	31
Figura 8	Em (a) Gel SDS-PAGE (gel de corrida 8% e gel de empilhamento 5%): 1 (Perfil dos marcadores de massa molecular – valores em kDa), 2 (Perfil da soroalbumina bovina), 3 (Perfil do extrato bruto), * (banda corresponde a exo-PG). Em (b) Gel PAGE (gel de corrida 8% e gel de empilhamento 5%): 1 (perfil do extrato bruto), * (banda corresponde à exo-PG)	32
Figura 9	Gráfico de Fischer (DENNISON, 2002) da migração relativa (RF) dos marcadores de massa molecular no gel de poliacrilamida da figura 8ª vs. o logaritmo da massa molecular desses marcadores	33
Figura 10	Gráfico de Fischer do coeficiente de distribuição K _d obtido por cromatografia de filtração em gel em Sephadex G-75 versus o logaritmo da massa molecular dos marcadores de massa molecular	33
Figura 11	Perfil de eluição da filtração em gel do extrato enzimático de <i>R. pusillus</i> aplicado a uma coluna GE XK-16/100 com Sephadex G-50. Valores de absorbância em 280 nm (linha preta) e valores de absor-	34

bância em 540 nm após a quantificação de açúcares redutores (linha azul)

- Figura 12 Géis SDS-PAGE (gel de corrida 10% e gel de empilhamento 5%), em 36
(a) 85 % de sulfato de amônio, (b) 90 % de sulfato de amônio e (c) 95 % de sulfato de amônio: 1 (Perfil dos marcadores de massa molecular – valores em kDa), 2 (Perfil do sobrenadante da precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 4 (Perfil do *pellet* da precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), * (banda corresponde a exo-PG). Em (d) resultado da HIC: 1 (Perfil dos marcadores de massa molecular – valores em kDa), 2 (perfil do resultado da HIC), * (banda corresponde a exo-PG)
- Figura 13 Perfil de eluição da cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). O 37
asterisco indica o volume de eluição da enzima.
- Figura 14 Caracterização bioquímica da exo-PG do extrato bruto (●) e pura (○): 38
(a) Variação da atividade da exo-PG em diferentes valores de pH; (b) Atividade residual da exo-PG quando incubada a diferentes pHs por 24 horas a temperatura ambiente, na ausência de substrato - para o cálculo da atividade residual usou-se como parâmetro uma amostra controle preparada pela mistura (1:1) da solução enzimática em água, incubada a temperatura ambiente por 24hs na ausência de substrato (controle = 100%); Nos gráfico são representados as médias (pontos) e desvios padrões (barras).
- Figura 15 Caracterização bioquímica da exo-PG do extrato bruto (●) e pura (○): 39
(a) Variação da atividade da exo-PG em diferentes valores de temperatura; (b) Atividade residual da exo-PG quando incubada a diferentes temperaturas por 1 hora, na ausência de substrato - para o cálculo da atividade residual usou-se como parâmetro uma amostra controle que não foi incubada a diferentes temperaturas (controle = 100%). Nos gráfico são representados as médias (pontos) e desvios padrões (barras).
- Figura 16 Preferência da exo-PG pura por quatro diferentes substratos: (A) 39
citrus pectin DE 26 e (B) 92 %; (C) apple pectin; (D) citrus pectin Genu 8001 DE 30 %. As barras representam a média de atividade enzimática e as barras os desvio padrão.
- Figura 17 Gráfico de Michaelis-Menten para a exo-PG pura de *R. pusillus*. 40
- Figura 18 Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (E_a) e 41
temperatura ótima da exo-PG pura. No gráfico são representados as médias (pontos) e desvios padrões (linhas verticais).
- Figura 19 Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o cálculo da energia de 42
ativação da desnaturação térmica ($E_{a(d)}$) da exo-PG pura. No gráfico

são representados as médias (pontos) e desvios padrões (linhas verticais).

- Figura 20 Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade da 43
exo-PG: 50 °C (■); 60 °C (●); 70 °C (▲) e 80 °C (▼). No gráfico
são representados as médias (pontos) e desvios padrões (linhas ver-
ticais).
- Figura 21 Perfil da eletroforese capilar dos produtos da hidrólise da exo-PG. No 45
gráfico são representadas quatro condições: Exo-PG+DA; Exo-
PG+ácido poligalacturônico; APTS+DA (padrão) e MA (padrão).
APTS (ácido 1,3,6-trissulfônico 8-aminopireno); DA (ácido digalacturô-
nico) e MA (ácido monogalacturônico).
- Figura 22 Resultados do sequenciamento da exo-poligalacturonase de *R. pu-* 46
sillus por espectrometria de massa. Os resíduos em vermelho cor-
respondem àqueles idênticos com a exo-PG de *Aspergillus fumi-*
gatus.
- Figura 23 Análise visual do volume e turbidez após a extração de suco das 47
polpas de maçã, uva e laranja. O experimento foi realizado em tripli-
cata, porém aqui estão registrados uma réplica para cada polpa. Em:
A= tratamento (polpa+extrato enzimático) e B=controle.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais fatores intrínsecos estabilizadores de termozimas.	8
Tabela 2	Descrição dos principais polissacarídeos pécticos.	11
Tabela 3	Efeito de cátions (concentração final de 10 mmol.L ⁻¹) na atividade da exo-PG parcialmente purificada.	35
Tabela 4	Tabela de purificação. Para o cálculo do rendimento considerou-se a condição inicial (extrato bruto) com rendimento 100 %. Para o cálculo do fator de purificação considerou-se a condição inicial (extrato bruto) com fator de purificação 1. A condição <i>salting-out</i> se refere ao sobrenadante obtido com uma saturação de 95 % de sal.	37
Tabela 5	Energia de ativação (Ea), temperatura ótima e coeficiente de temperatura (Q ₁₀) estimados com base na figura 18.	41
Tabela 6	Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da termoinativação irreversível.	43
Tabela 7	Volumes obtidos durante a extração de suco da polpa de maçã, uva e laranja.	47
Tabela 8	Composição química do bagaço de cana-de-açúcar usado nos experimentos.	48
Tabela 9	Determinação de açúcares redutores totais (ART), celulose e xilose liberados com na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Controle (apenas celulase); Exo-PG do extrato (celulase + exo-PG do extrato bruto) e Exo-PG pura (celulase + exo-PG pura). Em * não foi mensurado glicose e xilose pois não foi encontrado aumento em ART.	48

1. INTRODUÇÃO

Existem vários fatores que afetam o crescimento e a sobrevivência de microrganismos; dentre eles podemos citar o pH, a atividade de água, a salinidade e a temperatura, sendo esta última um dos principais fatores que afeta o crescimento dos microrganismos, inclusive dos fungos (MADIGAN et al., 2004). Algumas espécies de fungos, denominados de termofílicos moderados, possuem uma faixa de crescimento de 20 a 50 °C, com temperaturas ótimas entre 40 e 50 °C. Estes fungos produzem “termozimas”, que são enzimas estáveis a temperaturas mais elevadas (GOMES et al., 2007).

Um grupo muito importante de enzimas hidrolíticas encontradas em plantas e microrganismos como fungos filamentosos termofílicos, leveduras e bactérias, são as pectinases, as quais são capazes de degradar substâncias pécicas ou pectinas por hidrólise. Os polissacarídeos pécicos possuem uma estrutura molecular variada, sendo os principais deles a homogalacturonana e ramnogalacturonana I e II. (CANTERI et al., 2012).

De acordo com Uenojo e Pastore (2007), existem basicamente três tipos de pectinases: as desesterificantes ou desmetoxilantes, as despolimerizantes e as protopectinases.

As despolimerizantes podem pertencer às classes das liases ou das hidrolases. Estas últimas podem ser polimetilgalacturonases e as poligalacturonases. As polimetilgalacturonases hidrolisam o polimetilgalacturonato, transformando-o em oligometilgalacturonato, enquanto que as poligalacturonases hidrolisam a ligação glicosídica α (1 $\rightarrow$ 4) entre dois resíduos de ácido galacturônico, tanto de forma randômica (endopoligalacturonases) quanto sequencial (exopoligalacturonases) (UENOJO; PASTORE, 2007).

Dentre as diversas aplicações que as pectinases possuem na indústria podemos citar a aplicação na produção de sucos de frutas (laranja, por exemplo). Uma vez que pectina da parede celular vegetal aumenta a viscosidade do suco dificultando sua posterior filtração, o tratamento com pectinases comerciais promove a degradação da pectina, diminuindo a viscosidade e facilitando a filtração (DEMIR et al., 2001; KAUR et al., 2004).

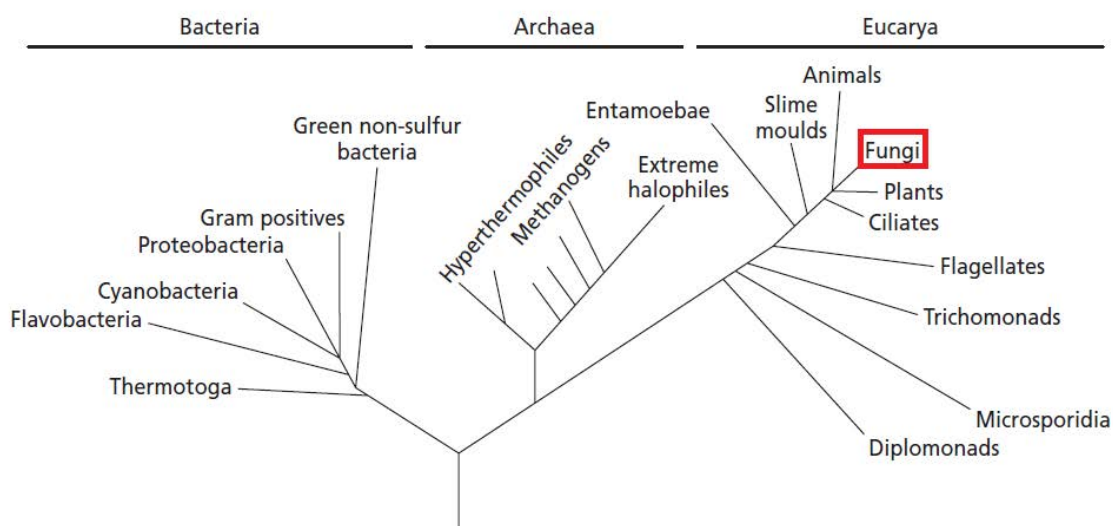
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIOLOGIA DOS FUNGOS

2.1.1. Características gerais dos fungos

A árvore da vida proposta por Carl Woese (figura 1), construída com base em análises de rRNA representa a relação filogenética entre os seres vivos, os quais encontram-se distribuídos em três domínios: Archaea, Bacteria e Eukarya. Pela árvore proposta é possível notar que os três grandes grupos de eucariotos - animais, plantas e fungos - formam um *cluster* e divergiram quase que ao mesmo tempo, sendo este um evento recente, há aproximadamente 500 milhões de anos, de onde datam os primeiros registros fósseis de fungos, pertencentes ao período ordoviciano (DEACON, 2005).

Figura 1. Representação da árvore filogenética universal, baseada em análises da subunidade 16S e 18S de rRNA, evidenciando o posicionamento dos fungos (Adaptado de Deacon, 2006).



Ainda de acordo com o mesmo autor, os fungos, sobretudo os filamentosos, possuem características em comum, das quais podemos citar:

- 1 – São eucariotos, possuindo, portanto membrana nuclear, além de regiões não-codificadoras, os íntrons, membrana contendo esteroides e ribossomos 80S;
- 2 – São formados por hifas, as quais possuem uma divisão funcional bem definida, isto é, as porções mais velhas absorvem nutrientes e água enquanto que a porção apical possui crescimento considerável e é responsável pela secreção

de proteínas, o que gera um padrão de crescimento radial, em nível macroscópico;

3 – São organismos quimio-organotróficos, utilizando componentes do ambiente como fonte de carbono e energia;

4 – Secretam, pela porção apical das hifas, enzimas (celulases, xilanases, pectinases, etc.) que despolimerizam polissacarídeos complexos até seus respectivos monômeros, os quais serão assimilados pelas porções mais velhas das hifas;

5 – Possuem parede celular com uma alta diversidade de componentes, tipicamente incluindo quitina e glicana;

6 – Estocam compostos como manitol, trealose e glicogênio;

7 – Podem reproduzir-se sexuadamente ou assexuadamente e também podem produzir diversos tipos de esporos.

Vários fatores podem afetar o crescimento dos fungos, dentre eles podemos citar a concentração de íons hidrogênio (pH), oxigênio e temperatura.

2.1.2. Efeito do pH no crescimento dos fungos

Quanto ao pH, alguns fungos podem crescer em pH 2, porém o seu pH ótimo em culturas é de 5,5 - 6,0, sendo esses fungos denominados de ácido-tolerantes, como é o caso de leveduras que crescem no estômago de animais e alguns fungos miceliais, como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* spp. Existem também fungos acidófilos verdadeiros, os quais possuem pH ótimo de crescimento entre 3 e 4,5 e alcalófilos que possuem o pH ótimo de crescimento compreendido entre 7,5 e 13, como *Chrysosporium*, que possuem pH ótimo cerca de 11,0 (DEACON, 2005; MADIGAN et al., 2004).

O pH citosólico das hifas possui capacidade tamponante e assim, mesmo que o pH do meio seja alterado, o pH celular não alterará mais que 0,2-0,3 unidades. Esta homeostase do pH é importante pois mantém um gradiente químico entre os meios internos e externo, gradiente este necessário para a existência da força próton-motora (FPM). Esta homeostase pode ser obtida por diversos mecanismos, dentre eles, por efluxo de íon H^+ através da célula para neutralizar a entrada desses íons do ambiente, por troca de materiais entre o citosol e os vacúolos (que geralmente possuem compostos ácidos) e por a interconversão de açúcares e polióis, tais como manitol, que envolve o sequestro ou a liberação de H^+ (DEACON, 2005).

2.1.3. Efeito do oxigênio sobre o crescimento dos fungos

Quanto à influência do oxigênio no crescimento, os fungos podem ser subdivididos em quatro grupos. Os aeróbicos estritos possuem o seu crescimento reduzido se a pressão parcial de oxigênio também for reduzida, isto porque estes fungos usam o oxigênio como o aceptor final de elétrons no processo de respiração celular; os fungos aeróbicos facultativos crescem em condições aeróbicas e também em condições anaeróbicas, neste caso por meio da fermentação de açúcares; alguns fungos aquáticos são fermentativos obrigatórios, pois crescem na ausência ou na presença de oxigênio, porém a energia é obtida pela fermentação uma vez que não possuem mitocôndrias ou citocromos, ou então possuem mitocôndrias rudimentares com baixo teor de citocromos. Os fungos anaeróbicos obrigatórios são encontrados no trato digestivo de ruminantes (DEACON, 2006).

A existência de fungos anaeróbicos obrigatórios, ressalta o mesmo autor, mostra o efeito tóxico das espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (OH^-). Assim, fungos que crescem na presença de oxigênio necessitam de mecanismos especiais para lidar com essa toxicidade das espécies reativas de oxigênio. Estes mecanismos são em sua maioria enzimáticos, como por exemplo, superóxido dismutase e catalase.

2.1.4. Efeito da temperatura no crescimento dos fungos

A temperatura é um dos principais fatores que afeta o crescimento dos microrganismos, inclusive dos fungos (MADIGAN et al., 2004), uma vez que afeta a função das biomoléculas e a estrutura das biomembranas (GOMES et al., 2007).

Os fungos psicrófilos possuem uma temperatura ótima de crescimento menor que 20 °C enquanto que nos fungos mesófilos esta mesma temperatura ótima é entre 25 e 37 °C (MADIGAN et al., 2004). Os fungos termófilos moderados crescem de 20 a 55 °C, sendo a temperatura ótima de crescimento entre 40 e 50 °C. (GOMES et al., 2007).

2.2. MICRORGANISMOS TERMOFÍLICOS

2.2.1. Ocorrência de microrganismos termofílicos

Das 50 mil espécies de fungos descritos, 30 podem crescer entre 40 e 45 °C, embora alguns cresçam em temperaturas de 60 e 62 °C (GOMES et al., 2007).

Os microrganismos termófilos, como fungos filamentosos, podem ser encontrados em processos de compostagem durante a fase de alta temperatura (40 °C), sucedendo os microrganismos mesofílicos (CHANG et al., 2005). Na primeira fase do pro-

cesso de compostagem os microrganismos mesofílicos crescem assimilando os açúcares simples, gerando calor, por reações exotérmicas, que elevam a temperatura da pilha de compostagem para aproximadamente 40 °C. O aumento da temperatura leva à germinação de esporos de fungos e bactérias termófilos que, devido à exaustão de açúcares simples, liberam enzimas extracelulares responsáveis por despolimerizar os componentes da biomassa. Durante a terceira e última fase, com a temperatura cerca de 60 °C ocorre inibição do crescimento dos fungos (MAHESHWARI et al., 2000).

2.2.2. Adaptações de membranas à termofilia

Em Archaea encontramos lipídios formados por glicerol-1-fosfato unido por ligação éter a repetidas unidades isoprenóides, ao contrário do que ocorre nos Eukarya e Bacteria termófilos, onde temos lipídios formados por glicerol-3-fosfato unido por ligação éster a ácidos graxos saturados. Ademais, ao contrário do que ocorre em Bacteria e Eukarya, as membranas de Archaea são organizadas em monocamadas. Este contraste entre membranas é referido atualmente *lipid divide* (KOGA, 2012).

No entanto os mesmos autores ressaltam ainda que a maior estabilidade atribuída às membranas de Archaea advém da maior estabilidade das ligações éter e não à presença de glicerol 1 fosfato (G1P), ao invés de G3P, uma vez que ambos são isômeros e apresentam as mesmas propriedades termoestáveis.

2.2.3. Adaptações de genoma e transcriptoma à termofilia

Em nível de genoma (DNA), estudos mostram que a desnaturação térmica do DNA é afetada pela composição dos nucleotídeos, deste modo, seria esperado um maior teor de G+C, ao invés de A+T, devido ao maior teor de pontes de hidrogênio que estabilizariam termicamente o DNA, no entanto estudos recentes mostram não haver correlação direta entre teor de G+C e termofilia, visto que *Aquifex aeolicus* tem um teor de G+C menor que 50 % enquanto que o mesofílico *Mycobacterium tuberculosis*, um mesófilo, tem um conteúdo de G+C mais elevado (SINGER ; HICKEY, 2004).

Assim entende-se que a estabilização do DNA deve principalmente aos seguintes fatores: presença de 2,5-difosfoglicerato cíclico de potássio que impede despurinação a altas temperaturas; DNA topoisomerase denominada de DNA girase reversa, que promove um superenovelamento positivo no DNA que garante maior resistência à desnaturação térmica; os hipertermófilos metanogênicos do reino Euryarchaeota, como *Sulfolobus*, possuem proteínas semelhantes a histonas que compactam o DNA em estruturas que se assemelham aos nucleossomos, mantendo a dupla fita em altas temperaturas; já os metanogênicos do reino Crenarchaeota não possuem proteínas

semelhantes a histonas, mas sim Sac7d que aumenta a temperatura de desdobramento (*melting*) do DNA por interação ao seu sulco menor (MADIGAN ; OREN, 1999).

Quando analisamos o transcriptoma notamos que RNAs estruturais, isto é, rRNA e tRNA, possuem uma correlação entre G+C e termoestabilidade. Ao contrário do que ocorre com o DNA, existe uma maior proporção de C+G nas regiões de fita dupla dos RNAs estruturais, garantindo uma maior estabilidade em altas temperaturas. No caso dos mRNAs a situação crítica não é o manutenção de uma estrutura secundária, uma vez que se apresentam em fita única, assim não seria esperado uma pressão seletiva para a estabilização em altas temperaturas, porém estudos recentes mostram que existe uma correlação entre o aumento de purinas no transcriptoma em nível de mRNA, sobretudo adenina, e o aumento da temperatura do ambiente (MADIGAN; OREN, 1999).

2.2.4. Adaptações à termofilia ao nível do proteoma

A termoestabilidade enzimática seja ela cinética ou dinâmica está relacionada ao desdobramento da proteína. A estabilidade é dependente, majoritariamente, de interações não covalentes como as iônicas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Adicionalmente outros fatores podem contribuir, como por exemplo sais, uma elevada concentração de proteínas, coenzimas, substratos, ativadores ou estabilizantes (VIEILLE; ZEIKUS, 2001), ligações dissulfeto e associação de oligômeros (JAENICKE, 1996a).

A termoestabilidade é ditada pelo equilíbrio entre forças de enovelamento e de desenovelamento, as quais podem ser entendidas em nível termodinâmico, sendo usualmente expressas como a temperatura de desnaturação T_m e a energia livre de estabilização da enzima ($\Delta G_{stab.}$), usualmente em torno de $45 \pm 15 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Esta corresponde à diferença de energia livre entre os estados enovelado e desenovelado da proteína, sendo definida pela relação $\Delta G_{estab} = \Delta H_{estab} - T \cdot \Delta S_{estab}$, onde T é a temperatura absoluta, em Kelvin, dependendo também da barreira energética da energia de ativação E_a . Uma versão mais completa dessa equação de Gibbs-Helmholtz desdobra o segundo termo, tornando explícito o papel das entropias de solvatação e da proteína: $\Delta G_{estab} = \Delta H_{estab} - T \cdot \Delta S_{solv} - T \cdot \Delta S_{prot}$ (JAENICKE, 1996b). Em alta temperatura o valor de $\Delta G_{stab.}$ será negativo, indicando que a temperatura é suficiente para desestabilizar e desnaturar a enzima. A T_m , temperatura na qual 50 % da proteína se encontra desenovelada, é usada para descrever a estabilidade de enzimas que apresentam desnaturação irreversível (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).

A desnaturação de uma proteína pode expô-la a alguns eventos. Uma vez desdobrada ocorre a exposição de sítios hidrofóbicos, antes internos, formando agregados que se precipitam. Também podemos citar como alteração decorrente da desnaturação a perda de cofatores e o re-enovelamento incorreto (TOMAZIC; LIBANOV, 1988).

Ao ser desnaturada uma proteína expõe resíduos de aminoácidos, os quais podem sofrer alterações, sendo as principais: desamidação da asparagina (Asn) e glutamina (Gln) por um mecanismo ácido-básico; hidrólise de ligações peptídicas, que ocorrem frequentemente no C-terminal lateral do ácido Aspártico (Asp), em ligações entre Asp'→Prolina (Pro); oxidação da metionina (Met); mudança da L-serina (Ser) para seu isômero D; reação da lisina (Lys) com açúcares redutores; etc. (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).

A adaptação das termozimas a altas temperaturas é resultado do equilíbrio entre rigidez estrutural e flexibilidade catalítica. A rigidez é necessária para a estabilidade de enovelamento da enzima em altas temperaturas enquanto que a flexibilidade é importante para a atividade catalítica. Assim, quando termozimas encontram-se na temperatura ótima de atividade, que geralmente é maior que 40 °C ocorre um movimento térmico e um aumento da flexibilidade essencial para a catálise. Se estas enzimas termofílicas são submetidas a temperaturas maiores do que a ótima o movimento térmico tornar-se-á tão acelerado que levará a perda da estrutura nativa. Quando as mesmas são submetidas a temperaturas menores que a ótima a flutuação térmica é reduzida e a mobilidade conformacional do sítio catalítico diminui, o que demonstra que estas enzimas não só toleram temperaturas acima da média, como também as requerem para a catálise (ARNOLD et al., 2001; FÁGÁIN, 1995).

Ao longo do processo evolutivo duas estratégias de termoestabilidade foram selecionadas: a estabilização por fatores intrínseco e extrínseco. Enquanto o primeiro está diretamente relacionado à estrutura das moléculas e conseqüentemente à rigidez de enovelamento, o segundo está relacionado à adaptação das termozimas ao meio, seja este intra ou extracelular (BRUINS et al., 2005).

Os fatores intrínsecos estão listados na tabela 1. O principal efeito intrínseco é denominado de efeito hidrofóbico, no qual resíduos hidrofóbicos são sequestrados para o interior da molécula evitando o contato com a água, formando-se deste modo núcleos hidrofóbicos no interior da termozima. Este aumento de cadeias apolares no interior dessas biomoléculas favoreceu o aumento da entropia de enovelamento uma vez que evita a formação de gaiolas de água, ou clatratos, em torno de grupos hidrofóbicos, isto é, não se formam estruturas altamente organizadas ao redor das termo-

zimas o que favorece o aumento da entropia de dobramento. Como consequência, as termozimas possuem alto teor de aminoácidos hidrofóbicos, como Ile e Val, e uma redução de suas cavidades interiores, de seu volume total e da área superficial (PACK; YOO, 2005).

Tabela 1. Principais fatores intrínsecos estabilizadores de termozimas.

Efeito intrínseco	Efeito na termozima
Alta proporção de Pro e baixa de Gly	A glicina possui muitas possibilidades de conformação, necessitando de uma maior energia para restringir sua conformação. Já a prolina possui poucas conformações devido ao seu anel pirrolidínico, diminuindo a sua entropia do estado não dobrado (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).
Estrutura secundária	Alto teor de α -hélice e de folha β -pregueada além de uma menor frequência de regiões irregulares (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).
Alta proporção de Ala	Alanina é o melhor aminoácido formador de α -hélice (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).
Alta quantidade de grupos polares carregados	Estes grupos estabelecem pontes salinas na molécula (ELCOCK, 1998).
Ligações dissulfeto	Reduzem a entropia de desdobramento da termozima. É interessante salientar que a Cys é oxidada a 100°C, sendo este talvez o limite da termoestabilidade (VIEILLE; ZEIKUS, 2001).
Ligação com metais	Acredita-se que a ligação com metais estabilize as enzimas uma vez que a perda destes metais afeta a especificidade e atividade da enzima. Além disso, algumas termozimas possuem metais que não estão presentes na sua homóloga mesofílica, indicando que a aquisição do metal é fator preponderante para a termoestabilidade (SEIFZADEH et al., 2008).
Encurtamento e ancoramento das porções C e N terminais	A porções N e C terminais possuem alta mobilidade e são, via de regra, onde se inicia o processo de desnaturação. Assim o encurtamento destas porções ou o seu ancoramento ao restante da proteína garante maior estabilidade (SHIMA et al., 2004).
Glicosilação	Corresponde a uma modificação pós-traducional, que pode ser do tipo O-glicosilação (ocorre na hidroxila da Ser e Thr) ou N-glicosilação (Asn-X-Ser/Thr, onde X não pode ser Pro) (WANG et al., 1996). Estudos têm mostrado um papel preponderante da

glicosilação na termoestabilidade, porém o mecanismo pelo qual esta estabilização ocorre ainda é alvo de estudos, sendo que para algumas enzimas, como fitases, existem poucos trabalhos publicados (ZHU et al., 2014).

Fonte: do próprio autor.

Os principais fatores extrínsecos relacionados a termoestabilidade são: sais inorgânicos que estabilizam as enzimas de modo específico e também por reduzirem a atividade de água, muitos solutos que estabilizam as proteínas citoplasmáticas contra a desnaturação térmica, e o próprio substrato é um fator de termoestabilidade (MUKLHOPADHYAY et al., 2003).

Outro fator extrínseco de estabilização são as chaperonas, sendo as mais conhecidas as da família Hsp70. Estas proteínas reenovelam proteínas desnaturadas pelo calor, direcionando assim o dobramento adequado das proteínas através de ligações com o polipeptídeos recém-sintetizados e evitando associações impróprias (MAYER et al., 2001).

2.3. ESTRUTURA BIOQUÍMICA DA PAREDE CELULAR VEGETAL

2.3.1. Componentes lignocelulósico e hemicelulósico da parede celular vegetal

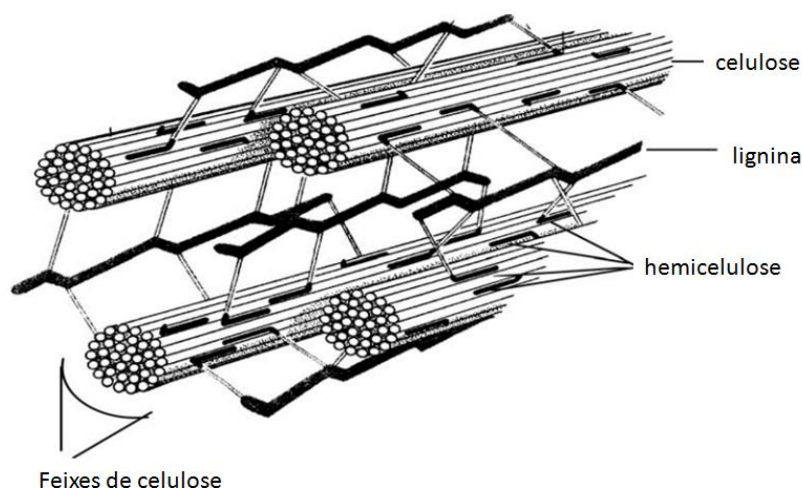
Como já foi mencionado anteriormente, os fungos termofílicos filamentosos liberam enzimas extracelulares responsáveis por despolimerizar os componentes da biomassa vegetal (MAHESHWARI et al., 2000). De acordo com Hamelinck et al. (2005), na composição do bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo, encontramos um material lignocelulósico que consiste em feixes de fibras e estruturas elementares, como vasos parenquimáticos e células epiteliais, sendo encontrado nesse em média 50 % de umidade, 48 % de fibra (32-50 % de celulose, 19-25% hemicelulose e 23-32 % de lignina) e 2 % de cinzas.

A parede celular vegetal (figura 2) é composta por diversos polissacarídeos e outros componentes, os quais são organizados por meio de ligações covalentes e não-covalentes. A parede celular primária, composta de celulose, hemicelulose e pectina, é depositada durante o crescimento da célula e deve ser suficientemente rígida, para evitar a ruptura celular, porém flexível, para permitir o crescimento da célula. A parede celular secundária é depositada com o cessar do crescimento da célula e é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (TAIZ; ZIEGER, 2002).

A celulose é um polímero de β -D-glicose, onde os monômeros são unidos por ligações β (1 $\rightarrow$ 4) e se organiza em uma estrutura microfibrilar. Possui regiões alta-

mente ordenadas – as regiões cristalinas – que são estabilizadas por ligações de hidrogênio e regiões menos organizadas, isto é, com orientação randomizada – a região amorfa (FARINAS, 2011).

Figura 2. Organização típica dos componentes da parede celular vegetal (MURPHY; McCARTHY, 2004).



A hemicelulose é um heteropolissacarídeo ramificado composto por pentoaldoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose). As principais hemiceluloses encontradas em plantas são os xiloglicanos (XyG), os glicuronoarabinoxilanos (GAX) e os mananos (MN) (BUCKERIDGE et al., 2010).

Já a lignina possui uma natureza fenólica, portanto um metabólito secundário vegetal, e é formada por três alcoóis: cumárico, coniferílico e sinapílico. Possui um papel cimentante na parede vegetal, sendo encontrada em tecidos de sustentação. Devido a este papel cimentante a lignina dificulta o acesso das celulasas às fibrilas de celulose (FARINAS, 2011).

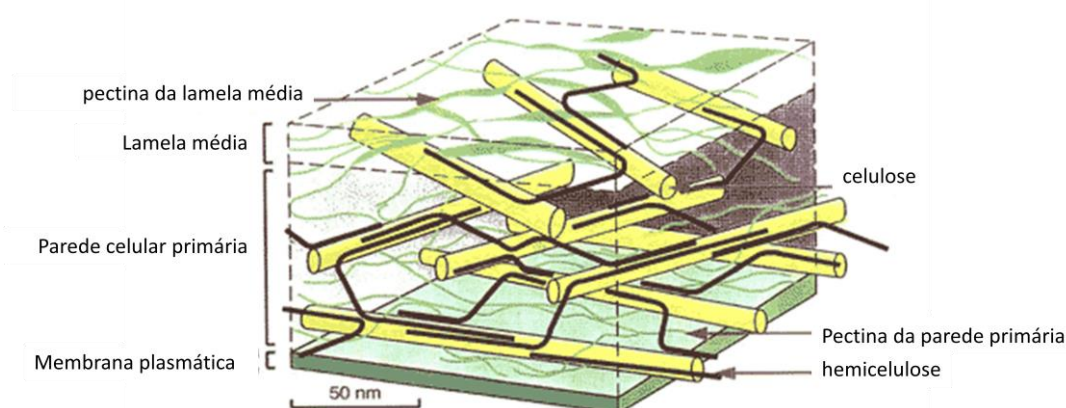
2.3.1. Componentes pécticos da parede celular vegetal

A quantidade de compostos pécticos varia de acordo com o produto vegetal, sendo que altos teores de pectina são encontrados em bagaço de maçã, albedo cítrico, polpa de beterraba e capítulos de girassol (THIBAUT, 1980). As principais pectinas comerciais são extraídas dessas fontes em meio levemente ácido, porém a capacidade de geleificação depende da massa molecular e do grau de esterificação desses polissacarídeos (CANTERI et al., 2012).

A pectina é encontrada na parede celular primária e na lamela média das células vegetais (figura 3), atuando no controle iônico e da porosidade da parede e garan-

tido adesão (ROMBOUTS; PILNIK, 1980). Dois modelos estruturais são propostos para a parede celular primária: tipo I, composto predominantemente por celulose, xiloglucanas, extensina e pectina (20-35%) e tipo II, compreendendo essencialmente celulose, glicoarabinoxilanas e compostos fenólicos, com menor proporção de pectina (10%) (CARPITA et al. , 2000). Já na lamela média encontra-se predominantemente pectina de alta metoxilação (MOHNEN, 2008).

Figura 3. Organização típica dos componentes da parede celular vegetal, evidenciando a presença de pectina na parede primária e na lamela média (Fonte: http://www.ippa.info/what_is_pectin.htm).



Os polissacarídeos pécticos possuem uma estrutura molecular variada, podendo ser classificados de acordo com a mesma (figura 4). Os principais polissacarídeos pécticos estão descritos na tabela 3, construída com base em Voragen et al., 2009.

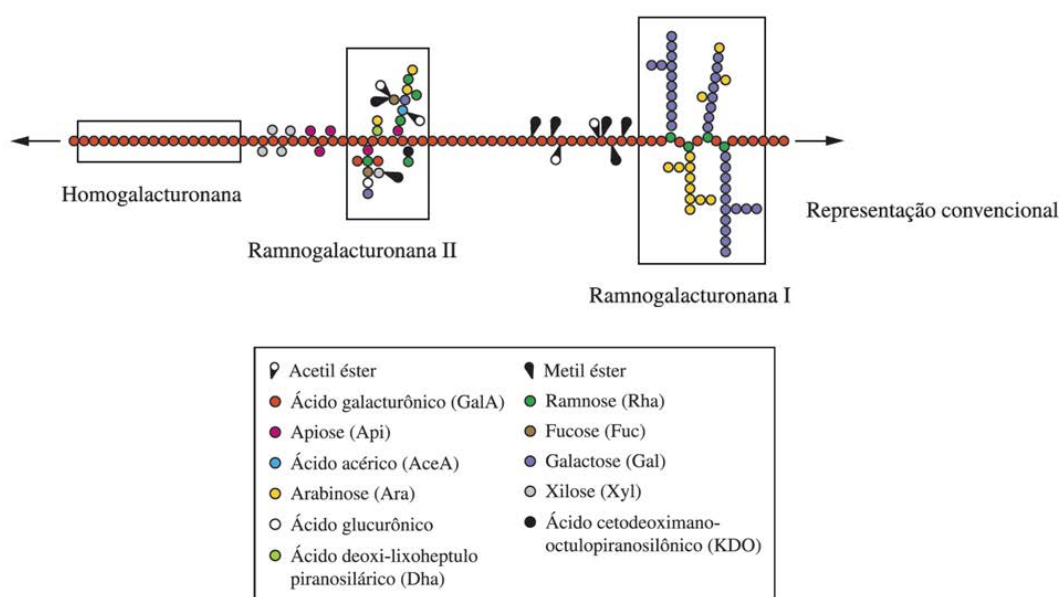
Tabela 2. Descrição dos principais polissacarídeos pécticos.

Polissacarídeo péctico	Descrição
Homogalacturonana (HG)	Principal e mais abundante polissacarídeo péctico, correspondendo a 60-65 % do total de pectina. Possui um esqueleto de ácido galacturônico unidos por ligação α (1→4) em um padrão linear. Os grupos carboxila estão parcialmente metil-esterificados e as cadeias podem ser O-acetiladas no C-3 ou C-2.
Ramnogalacturonana I (RG-I)	Corresponde a 20-35 % do total de pectinas. Apresenta diferentes cadeias de glucanas (arabinana e galactana) ligadas a unidades de ramnose.

Ramnogalacturonana II (RG-II)	É a pectina mais complexa e representa cerca de 10 % do total de pectinas. Possui um esqueleto de no mínimo oito ácidos galacturônicos, contendo cadeias laterais de até 12 diferentes tipos de monossacarídeos. A estrutura descrita é muito conservada nos vegetais.
Xilogalacturonana (XGA)	Homogalacturonana com xilose ligada na posição 3. O grau de xilosidação pode variar entre 25 % (melancia) a 75 % (maçã).
Arabinogalactana (ARA-I)	I Composta por esqueleto β -D-Galp; resíduos de α -L-Araf podem estar ligados às unidades galactosil na posição 3.
Arabinogalactana (ARA-II)	II Composta de um esqueleto β -D-Galp 1 $\rightarrow$ 3, contendo cadeias curtas de [α -L-Araf (1 $\rightarrow$) β -D-Galp (1 $\rightarrow$ 6)] _n onde n = 1, 2 ou 3. Possui uma parte proteica rica em prolina, hidroxiprolina, alanina, serina e treonina.

Fonte: do próprio autor.

Figura 4. Representação convencional da HG, RG-I e RG-II (adaptado de Canteri et al., 2012).



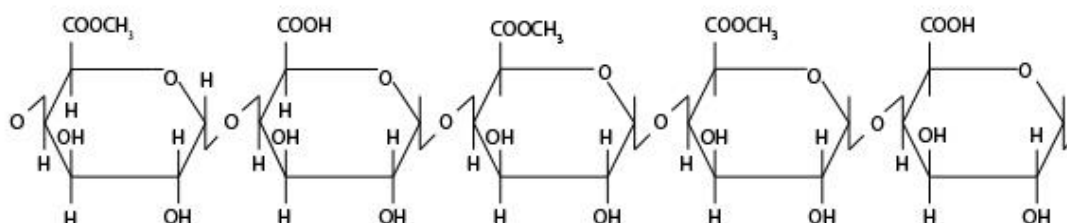
2.4. PECTINASES

2.4.1. Principais pectinases e mecanismos de catálise

As pectinases correspondem a um grupo bastante diverso de enzimas que degradam os polissacarídeos pécticos. De acordo com Uenojo e Pastore (2007), existem basicamente três tipos de pectinases: as desesterificantes ou desmetoxilantes, as despolimerizantes e as protopectinases.

As pectinases desesterificantes (como a pectina esterase) catalisam a hidrólise dos grupos metil-éster da pectina (figura 5), ocorrendo assim a liberação de metilas e conversão de pectina em pectato (PEDROLLI et al., 2009; UENOJO; PASTORE, 2007).

Figura 5. Representação de uma parte da sequência principal da pectina, formada por galacturonato eventualmente metilado no carbono 6 (Fonte: <http://sciexplorer.blogspot.com.br/2012/08/jam-science-first-let-me-be-clear-i-am.html>)

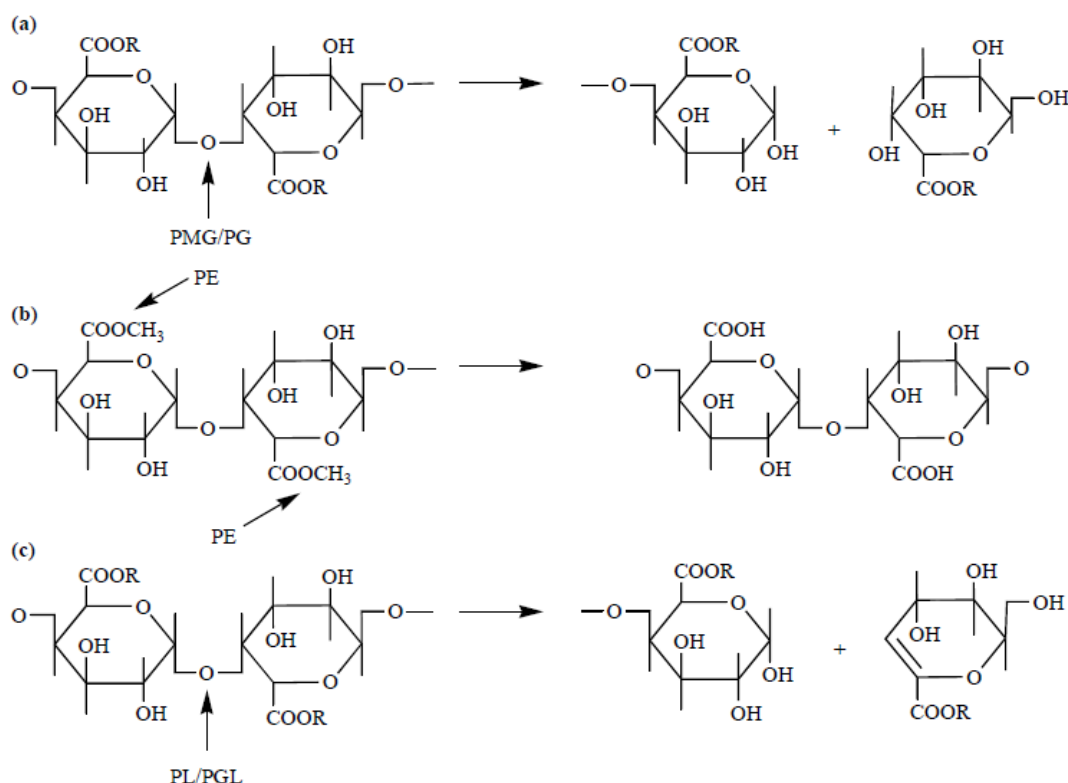


As pectinases despolimerizantes podem pertencer às classes das liases ou das hidrolases. Estas últimas podem ser polimetilgalacturonases e as poligalacturonases. As polimetilgalacturonases hidrolisam o polimetilgalacturonato, transformando-o em oligometilgalacturonato, enquanto que as poligalacturonases hidrolisam a ligação glicosídica $\alpha(1 \rightarrow 4)$ entre dois resíduos de ácido galacturônico, tanto de forma randômica (endopoligalacturonases) quanto sequencial (exopoligalacturonases). Já as liases catalisam uma reação de β -eliminação, isto é, rompem ligações glicosídicas $\alpha(1 \rightarrow 4)$ resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico, e podem ser: pectina liase (catalisa a β -eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados, de modo endo ou exo) e pectato liase (catalisa a β -eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico do pectato, de modo endo ou exo) (PEDROLLI et al., 2009; UENOJO; PASTORE, 2007).

Por último, as protopectinases solubilizam protopectina, formando pectina solúvel altamente polimerizada e podem ser divididas em tipo A (reage com o sítio interno, isto é, a região do ácido poligalacturônico da protopectina) ou tipo B (reage com o sítio externo, ou seja, com as cadeias de polissacarídeos que podem estar conectadas às

cadeias de ácido poligalacturônico) (PEDROLI et al., 2009; UENOJO; PASTORE, 2007). O mecanismo catalítico das principais enzimas pectinolíticas está representados na figura 6.

Figura 6. Modo de ação das principais pectinases. (a) R = H para PG e CH₃ para PMG; (b) PE; e (c) R = H para PGL e CH₃ para PL. As siglas indicam os locais onde as enzimas reagem com as substâncias pécicas. PMG, polimetilgalacturonases; PG, poliga-lacturonases; PE, pectinaesterase; PL, pectina liase (PEDROLI et al., 2009).



2.4.2. Principais aplicações das pectinases

As substâncias pécicas são responsáveis por atribuir um aspecto turvo aos sucos de frutas e a sua presença aumenta a viscosidade dos sucos, o que dificulta os processos de filtração posteriores (UENOJO; PASTORE, 2007). Hoje, para otimizar o processo de produção são acrescidas ao suco, no intuito de melhorar a extração e clarificação, pectinases, celulases e hemicelulases, conhecidas conjuntamente como enzimas de maceração (KAUR et al., 2004).

O tratamento com poligalacturonase, pectina metil esterase e pectina liase leva a uma degradação das pectinas da lamela média, levando a uma liquefação total ou quase que total da polpa da fruta. A degradação da pectina da parede celular permite uma melhor extração dos componentes da fruta e reduz em 50 % o tempo de filtração,

uma vez que se diminui a viscosidade do preparado, além de se diminuir a quantidade de resíduos (DEMIR et al., 2001).

Na indústria vinícola as pectinas são adicionadas durante o esmagamento das uvas ou nos mostos com o propósito de melhorar a extração de pigmentos como antocianinas e taninos e de terpenos (compostos aromáticos) por meio da maceração da casca, além de melhorar os processos de clarificação e filtração. O acréscimo de enzimas pectinolíticas melhora as características visuais do vinho, tanto cromáticas quanto a turbidez (FERNÁNDEZ et al., 2004).

Usualmente os óleos vegetais são extraídos com hexano, um solvente orgânico e potencial carcinogênico. Recentemente as enzimas de maceração passaram a ser adicionadas durante a prensagem da azeitona, durante a extração do óleo de oliva (SHARMA; SATYANARAYANA, 2006). A extração destes óleos com enzimas pectinolíticas permite que o processo ocorra em meio aquoso além de aumentar a quantidade de agentes anti-oxidantes e de vitamina E em óleo de oliva extravirgem, diminuindo ainda a formação de ranços (BHAT, 2000).

Por outro lado, fibras dietéticas atuam como prebióticos e existem evidências que elas podem modular o sistema imune (SCHLEY ; FIELD, 2002). Assim, os polisacarídeos pécticos estão emergindo como uma alternativa de compostos alimentares bioativos. Estas fibras vegetais podem ser tratadas com pectinases, gerando oligogalacturonídeos que podem estimular o crescimento da microbiota do cólon intestinal (LANG; DÖRNENBURG, 2000). A pectina metil esterase, por exemplo, está ganhando atenção na indústria de alimentos funcionais. A desmetilação de uma pectina e posterior adição de Ca^{+2} gera uma pectina de alta viscosidade que pode reduzir a absorção de colesterol pelo intestino (KHAN et al., 2013).

As pectinases também são usadas na fermentação do café e do chá, pois facilitam a fermentação por remover a mucilagem dos grãos e na indústria têxtil, pois removem a camada de pectina que recobre as fibras de celulose (UENOJO; PASTORE, 2007).

3. JUSTIFICATIVA

As enzimas pectinolíticas têm grande aplicabilidade nas indústrias de vinho, na extração de óleos vegetais, na elaboração de alimentos funcionais, na indústria têxtil e na indústria de sucos de frutas. Neste último caso, essas enzimas atuam degradando a pectina e diminuindo a viscosidade dos sucos, facilitando assim o processo de filtração (UENOJO; PASTORE, 2007).

Uma revisão realizada recentemente em bases de dados (Entrez-Pubmed) e sites da área, como BRENDA (<http://www.brenda-enzymes.info/>), mostraram a carência de dados a respeito da exo-PG de *R. pusillus*, motivando-nos assim a estudar as propriedades desta enzima para avaliarmos o seu potencial para eventuais aplicações.

4. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste trabalho foram produzir a galacturana 1,4-alfa-galacturonidase¹ (E.C. 3.2.1.67) também denominada exo-poligalacturonase do fungo termofílico *Rhizomucor pusillus*, por meio de cultivo submerso, purificá-la, caracterizá-la e aplicá-la na extração de sucos de frutas, bem como enzima complementar na sacarificação da biomassa lignocelulósica.

Já os objetivos específicos foram:

1. Produzir a enzima extracelular exo-poligalacturonase do fungo termofílico *Rhizomucor pusillus* por meio de cultivo submerso (Csm);
2. Caracterizar a enzima do extrato bruto quanto à temperatura e pH ótimos de atividade e quanto à estabilidade térmica e relacionada ao pH;
3. Determinar a massa molecular da enzima por métodos desnaturantes e não-desnaturantes;
4. Determinar o ponto isoelétrico da enzima;
5. Determinar o padrão de hidrólise da enzima;
6. Estabelecer um protocolo de Purificação;
7. Caracterizar a enzima pura quanto à temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e relacionada ao pH e efeito de cátions na atividade da enzima;
8. Análise dos parâmetros cinéticos da enzima pura;
9. Análise dos parâmetros termodinâmicos da enzima pura por meio da termodinâmica da termoinativação irreversível;
10. Sequenciamento da enzima por MALDI-TOF;
11. Aplicar a enzima do extrato bruto e parcialmente purificada na extração de suco de laranja, maçã e uva;
12. Aplicar a enzima do extrato bruto e parcialmente purificada como enzima complementar no processo de sacarificação da biomassa lignocelulósica.

¹ Nome recomendado de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, IUBMB: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/67.html>, acesso em 19/6/2014.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Obtenção e preparo do bagaço de laranja

O bagaço de laranja incorporado ao meio de cultura foi obtido por doação na empresa “Jet Suco”, na cidade de São José do Rio Preto. Uma vez no laboratório, foi necessário lavar, secar, triturar e selecionar o tamanho das partículas de bagaço.

A lavagem do bagaço, necessária para reduzir o teor de glicose do material, foi realizada de acordo com seguinte procedimento: o bagaço foi lavado 15 vezes, sendo posteriormente deixado de molho por volta de 24 horas. A cada hora a água era retirada e trocada (exceto durante a noite). Uma amostra da água em que o bagaço ficou *overnight* foi coletada para a quantificação de açúcares redutores.

A determinação da concentração de açúcares redutores foi realizada pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944). Um mL da solução de Somogyi-Nelson I foi adicionado a 500 µL da amostra, sendo ambos incubados a 100 °C por 10 minutos. Os tubos foram resfriados, e posteriormente foi adicionado 1 mL da solução de Somogyi-Nelson II a cada tubo. Foi feita uma análise por comparação visual do teor de açúcares redutores em comparação com um controle em que a amostra foi trocada por água, como avaliação da presença de açúcares redutores após a lavagem.

O bagaço foi triturado ainda úmido e colocado para secar em uma estufa a 60 °C por 64 horas, sendo posteriormente triturado em um liquidificador (para a redução dos grãos) e peneirado, visto que o tamanho de bagaço a ser utilizado no cultivo submerso foi padronizado (de 0,1 a 0,59 mm), para melhor sucesso da técnica.

5.2. Microrganismo

O fungo filamentoso termofílico utilizado no presente trabalho foi *Rhizomucor pusillus* A 13.36, mantido em meio PDA (*potato dextrose agar*) e obtido do estoque do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), câmpus de São José do Rio Preto.

5.3. Pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado com 39 g/L de PDA e 1 % de pectina comercial, pH 5,0. Os pré-inóculos foram preparados em Erlenmeyers de 250 mL, com 50 mL de meio nutriente cada. O fungo foi inoculado com o auxílio de alça de repique, e colocado para crescer em uma estufa BOD a 45 °C por 48 horas.

5.4. Cultivo submerso (CSm)

O cultivo ocorreu em Erlenmeyers de 250 mL contendo 40 mL de meio líquido esterilizado, composto por 1 % de bagaço de laranja, 1 % de farelo de trigo e os seguintes nutrientes (g/L): 1,0 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,0 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,11 H_3BO_3 ; 0,05 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,05 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,016 $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,016 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,011 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,5 EDTA. O meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C durante 30 minutos e inoculado com um volume de suspensão de esporos equivalente a 10^7 esporos/mL. A contagem de esporos foi feita com o uso de câmara de Neubauer.

O cultivo ocorreu em uma incubadora com agitação (*shaker*) a 100 rpm por 120 h a 45 °C. A cada 24 h um frasco foi retirado e seu conteúdo foi filtrado, sendo este submetido a uma avaliação da atividade enzimática (item 5.6), importante para a confecção de uma curva de produção. Para a confecção da mesma, os experimentos foram realizados em triplicata.

O experimento mostrou que o período de fermentação igual a 96 horas é suficiente para a obtenção da máxima produção da exo-poligalacturonase (exo-PG); deste modo, esse tempo foi estipulado para os processos de fermentação realizados posteriormente.

5.5. Clarificação do extrato

O material obtido durante este tempo foi filtrado em papel filtro de celulose com poros de 14 μm (Qualy®) e depois centrifugado a 4 °C e 10.000 xg em centrífuga *Jouan CR3i*, sendo o sobrenadante utilizado para os passos seguintes de caracterização e purificação.

5.6. Quantificação de açúcares redutores

Para a confecção da curva de produção e as posteriores análises de atividade enzimática utilizou-se o método de dosagem de açúcares redutores de Miller (1959), o qual utiliza ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS). A atividade da Exo-PG foi ensaiada em uma mistura de reação composta de 225 μL de substrato (solução de pectina cítrica a 1 % com grau de esterificação de 26 % em tampão acetato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ pH 5,0) e 25 μL da solução enzimática bruta. É importante ressaltar que após ser determinado o tempo de linearidade na formação do produto (item 5.16.) o tempo de reação foi padronizado em 4 min.

Para a realização do ensaio, os materiais anteriormente citados foram incubados a 60 °C por 10 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 250 μL de DNS.

Os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria fervente por 5 minutos. Adicionou-se 2 mL de água e após o resfriamento, realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm. Foi considerado que uma unidade de atividade enzimática (IUBMB, 1979) é a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto. A curva padrão foi confeccionada utilizando glicose (Sigma-Aldrich).

5.7. Quantificação de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais se deu pelo método de Bradford (1976): 1,25 mL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich) foram adicionados a 25 μ L de amostra, a reação ocorreu por 10 min. e posteriormente realizou-se a leitura da absorbância em 595 nm. Para a confecção da curva padrão foi utilizada albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich).

5.8. Análises eletroforéticas: SDS-PAGE

O perfil proteico foi analisado por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE (RHODES ; LAUE, 1990; SEE ; JACKOWSKI, 1990). O gel de corrida preparado foi de 8 ou 10 %, o gel de empilhamento foi de 5 %, o tampão utilizado foi Tris 25 mM – Glicina 0,2 M (pH 8,3). A amostra foi preparada na proporção 1 de amostra: 1 de glicerol 20 % + azul de bromofenol, sendo aplicados aproximadamente 30 μ L de amostra em cada poço. Como método de coloração utilizou impregnação por nitrato de prata (ALFENAS, 1998). Foram aplicados ao gel 2 μ L de albumina de soro bovino e 3 μ L de marcadores de massa molecular *Wide range* (Sigma-Aldrich). Os géis e o tampão de corrida continham SDS.

5.9. Análises eletroforéticas: Zimograma

O zimograma para a Exo-PG seguiu o protocolo estabelecido por Polizeli et al. (2012): após a corrida, o gel contendo a enzima foi incubado com o substrato (solução contendo 1% de pectina cítrica com grau de esterificação de 26 %, em tampão acetato de sódio 0,2 mol.L⁻¹ e pH 5,0). O gel foi incubado com o substrato por 2 horas a 50 °C e corado com solução de vermelho de rutênio 0,02 %, o qual é capaz de interagir com o substrato, exceto na região onde o substrato foi hidrolisado pela Exo-PG. Esta técnica foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa dirigido pela Profa. Dra. Maria de Lourdes T. de Moraes Polizeli (USP de Ribeirão Preto).

5.10. Estimativa da massa molar da Exo-PG em condições nativa e desnaturante

A estimativa da massa molar em condições desnaturantes foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), usando gel de corrida a 8 % e gel de empilhamento a 5 %. Este método foi utilizado para estimar a massa molecular da enzima em condição desnaturante, em comparação com padrões de proteínas globulares de massa conhecida, através da confecção de um gráfico do logaritmo da massa molecular vs. a migração relativa no gel.

A estimativa da massa molar em condição nativa foi feita por cromatografia de filtração em gel, sendo a massa molecular da Exo-PG estimada através da confecção de um gráfico do logaritmo da massa molecular vs. coeficiente de distribuição (Kd) de padrões de proteínas globulares de massa molecular conhecida: anidrase carbônica (29 kDa), mioglobina (17,8 kDa) e soroalbumina (66 kDa). Passamos também Azul Dextran e ATP (adenosina trifosfato) para estimativa do volume de exclusão e da fase estacionária, respectivamente. A passagem desses padrões permitiu calcularmos o coeficiente de partição (DENNISON, 2002) pela equação abaixo, na qual os volumes foram determinados em mL:

$$Kd = (Ve - Vo) / (Vs) \quad \text{equação 1}$$

Onde,

Kd = coeficiente de distribuição (varia de 0 a 1);

Ve = volume de eluição do pico de absorbância de cada padrão proteico e da exo-PG;

Vs = volume interno ou da fase estacionária (volume de eluição do ATP);

Vo = volume de exclusão (volume de eluição do azul de dextran).

Os padrões de massa molecular e uma amostra de extrato bruto contendo exo-PG foram submetidos a uma cromatografia de filtração em gel. A coluna utilizada foi uma GE XK-16 (16/100) preenchida com Sephadex G-75 (volume de resina de aproximadamente 160 mL). A coluna foi equilibrada para pH e condutividade usando uma bomba peristáltica *Pharmacia* P-1 e em seguida acoplada a um sistema *FPLC GE Äkta Purifier UPC10*. O tampão utilizado foi acetato de sódio 10 mM (contendo 50 mM de NaCl e pH 5,0), o fluxo utilizado foi de 0,2 mL/min. (fluxo linear de aproximadamente 5 cm/h), sendo que foi coletado 1 mL por tubo de ensaio.

O perfil de eluição dos padrões de massa molecular e das proteínas do extrato bruto foi acompanhada pela absorbância em 280 nm. Os picos de absorbância do extrato bruto foram submetidos à determinação de açúcares redutores pelo método de Miller (1959) antes descrito para identificação do pico de eluição de exo-PG.

5.11. Caracterização bioquímica da exo-PG presente no extrato bruto frente às variações de pH e temperatura

A atividade da exo-poligalacturonase foi testada em função do pH pela determinação de açúcares redutores de Miller (1959) a 60°C. Foram utilizados os tampões listados a seguir, todos na concentração 0,1 mol.L⁻¹ contendo 1 % de pectina cítrica (grau de esterificação de 26 %): citrato de sódio (pH 2,0 a 3,0), acetato de sódio (pH 3,5 a 5,5), MES (pH 6,0 e 6,5), HEPES (pH 7,0 a 7,5), glicina (pH 8,0 a 9,5), CAPS (pH 10,0 a 11,0). Cabe aqui observar que quando necessário o pH dos tampões foi ajustado para corrigir o efeito de deslocamento do pKa em função da temperatura, seguindo valores tabelados de $\Delta pK_a/^\circ C$ (APPLICHEM, 2008).

A atividade da exo-poligalacturonase foi testada em função da temperatura (30 a 80 °C) pela determinação de açúcares redutores de Miller (1959), na condição de pH determinada como ótima, contendo 1 % de pectina cítrica (grau de esterificação de 26 %).

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada na ausência de substrato, sendo medida a atividade residual da exo-PG após uma hora de incubação a temperaturas que variaram de 30 a 80 °C (SAQUIB et al., 2012).

A estabilidade relacionada ao pH foi avaliada por meio da mistura (1:1) da solução enzimática em soluções tampão 0,1 mol.L⁻¹ de citrato de sódio (pH 2,0 a 3,0), acetato (pH 3,5 a 5,5), MES (pH 6,0 e 6,5), HEPES (pH 7,0 a 7,5), glicina (pH 8,0 a 9,5) e CAPS (pH 10,0 a 11,0), sendo a atividade residual medida após a incubação por 24 h na ausência de substrato, mantida à temperatura ambiente. Para o cálculo da atividade residual usou-se como parâmetro uma amostra controle preparada pela mistura (1:1) da solução enzimática em água, incubada a temperatura ambiente por 24 h na ausência de substrato (controle de 100 %).

5.12. Efeito de cátions na atividade da exo-PG parcialmente purificada

A presença de contaminantes e de cátions da solução nutriente no extrato bruto não permite uma análise confiável do efeito de íons na atividade da exo-PG. Deste modo foi necessário purificar parcialmente a exo-PG a fim de retirar os sais e contaminantes do extrato bruto.

A purificação parcial seguiu o seguinte protocolo, o qual já havia sido previamente testado: 30 mL de extrato bruto obtido pela fermentação submersa foram concentrados 30 vezes através de ultra-filtração por centrifugação, utilizando um sistema *Vivaspin* (GE) com uma membrana com corte de 10 kDa (7.000 xg e 2 °C).

A amostra (aproximadamente 1 mL) foi submetida a uma cromatografia de filtração em gel. A coluna utilizada foi uma coluna GE XK-16 e a resina utilizada foi Sephadex G-50 (volume de aproximadamente 120 mL). Esta resina não permite que moléculas maiores que 30 kDa entrem nos poros, migrando rapidamente através da resina e eluindo no volume de exclusão.

A coluna foi acoplada a um sistema *FPLC GE Akta Purifier UPC10* e equilibrada com o tampão, checando pH e condutividade. O tampão utilizado foi acetato 0,01 mol.L⁻¹, pH 5,0 (contendo 0,05 mol.L⁻¹ de NaCl), o fluxo utilizado foi de 0,2 mL/min., coletando 1 mL por tubo de ensaio.

A eluição de proteínas foi acompanhada pela absorbância em 280 nm, e os picos de absorbância foram submetidos à determinação de açúcares redutores pelo método de Miller (1959).

Uma vez com a enzima parcialmente purificada, testou-se o efeito de vários cátions na atividade enzimática através da adição de diversos sais variando o cátion e mantendo o íon cloreto (na concentração final de 10 mmol.L⁻¹) individualmente à solução do ensaio enzimático: NaCl, MgCl₂, AlCl₃, KCl, FeCl₃, CaCl₂, BaCl₂, MnCl₂.

5.13. Focalização isoeletrica (IEF)

A focalização isoeletrica foi feita em um sistema de eletroforese horizontal *BIO-RAD*. O gel foi preparado pela seguinte mistura de reagentes, suficientes para suportes de eletroforese de 10 x 6,25 cm: 0,22 g de agarose foram dissolvidos em 13,2 mL de água deionizada e a solução foi aquecida em micro-ondas por aproximadamente 30 segundos. Na sequência acrescentou-se 1,6 mL de anfólitos (faixa de pH de 3 a 10). A mistura foi adicionada ao suporte e esperou-se solidificar. Preparou-se também uma solução de H₃PO₄ 1 mol.L⁻¹ (solução anódica) e NaOH 1 mol.L⁻¹ (solução catódica), as quais ficaram em contato com as extremidades do gel através de dois pedaços de papel filtro, um para cada polo.

A pré-focalização, para a organização dos anfólitos, ocorreu por 15 min. a 5 mA. Ao fim da pré-focalização a amostra foi aplicada a uma canaleta única no centro do gel. Após a aplicação da amostra aumentou-se a amperagem para 8 mA e a corrida se deu por 40 min. A pré-focalização e a corrida ocorreram em uma bandeja de gelo, para a dissipação do calor.

Ao fim da corrida o gel foi recortado em tiras de aproximadamente 1 cm e cada uma foi misturada com 1 mL de água deionizada em tubo de ensaio, desfazendo o gel com auxílio de um bastão de vidro. Na sequência as frações foram submetidas ao ensaio enzimático conforme descrito anteriormente. Para os tubos nos quais foi encon-

trada atividade enzimática, foi medido o pH, sendo este estimado como o pI da exo-PG.

5.14. Purificação da exo-PG

5.14.1. Precipitação salina (*salting-out*) com sulfato de amônio

A precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ocorreu conforme o protocolo descrito por Scoopes (1993): um volume de 10 mL de extrato bruto foi precipitado com 85, 90 e 95 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à temperatura ambiente e sob agitação. Também foi adicionado ao processo tampão acetato 50 mmol.L⁻¹ (para evitar o efeito acidificante do sal) e EDTA 2 mM (para quelar cátions traços do sulfato de amônio que porventura poderiam atuar como inativadores da exo-PG). Após a solubilização do sal esperou-se 30 min. à temperatura ambiente e depois se centrifugou a mistura a 3.000 xg por 40 min. O precipitado foi removido e armazenou-se o sobrenadante (aproximadamente 12 mL).

Uma amostra de 1 mL do sobrenadante foi precipitada com ácido tricloroacético (TCA) pelo método de Sanchez (2001) e o *pellet* foi ressuscitado em 40 µL de azul de bromofenol + glicerol 20 %. A precipitação com TCA é importante como passo prévio às análises eletroforéticas, uma vez que concentra a proteína e remove o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que porventura poderia interferir na eletroforese. Após as análises eletroforéticas da precipitação com 95 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, constatou-se que a exo-PG se encontrava no sobrenadante praticamente livre de demais contaminantes, sendo que esta condição de *salting-out* foi escolhida para dar continuidade aos demais experimentos.

5.14.2. Diálise

Para monitorar o rendimento e fator de purificação do processo de purificação foi necessário retirar o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ presente na amostra precipitada com 95 % de sulfato de amônio, uma vez que se trata de um interferente na determinação da concentração de proteína pelo método de Bradford e no ensaio enzimático. Para isto a amostra foi dessalinizada *overnight*, contra água, em tubos de diálise com membrana de acetato de celulose com 25 mm de diâmetro e corte de 3 kDa (Sigma-Aldrich).

5.14.3. Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC)

Apesar da pureza da amostra obtida com o *salting-out* ser considerada suficiente para dar continuidade aos experimentos, a HIC foi realizada com a finalidade de determinar os resíduos da exo-PG por espectrometria de massa MALDI-TOF, uma vez que se trata de uma técnica muito sensível.

Aproximadamente 1 mL de sobrenadante não dialisado, e portanto ainda com 95 % de sulfato de amônio, foi aplicado em uma coluna *HiTrap™ Phenyl HP GE* (volume da resina de 1 mL). O tampão inicial utilizado foi acetato de sódio 50 mM contendo 95 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e EDTA 2 mM, pH 5,0. O tampão final foi acetato de sódio 50 mM pH 5,0.

O fluxo utilizado foi de 1 mL/min., sendo que foi coletado 0,5 mL por tubo de ensaio. O perfil de eluição foi acompanhado pela absorbância em 280 nm, e os picos de absorbância foram submetidos à SDS-PAGE, sendo que os tubos nos quais foi detectada a exo-PG tiveram seu conteúdo dialisado para que fosse possível monitorar o processo de purificação.

5.15. Caracterização da exo-PG pura

A caracterização da exo-PG pura foi feita utilizando o sobrenadante obtido da precipitação (saturação de 95 %) e dialisado, por apresentar pureza e rendimento suficientes.

5.15.1. Caracterização da exo-PG pura frente às variações de pH e temperatura

A caracterização da exo-PG pura se deu do mesmo modo que o descrito no tópico 5.11.

5.15.2. Caracterização da exo-PG pura quanto ao substrato ótimo de catálise

Por meio da determinação de açúcares redutores de Miller (1959) foi testada a preferência da exo-PG por quatro substratos diferentes: *citrus pectin* DE 26 e 92 %, *apple pectin* e *citrus pectin* Genu 8001 DE 30 %. O substrato para a reação foi tampão acetato de sódio 0,2 mol.L⁻¹, pH 5,0 contendo, individualmente, 1 % dos diferentes substratos mencionados.

5.16. Estudo cinético da exo-PG

Primeiramente foi analisado o tempo de linearidade na liberação do produto pela exo-PG para determinação da taxa de reação inicial V_0 , por meio da quantificação de açúcares redutores pelo método de Miller (1959) em tempos de reação que variaram de 1 até 10 min. O tempo de linearidade na liberação do produto foi estimado em 4 min. e os demais ensaios da caracterização cinética e da terminativação irreversível foram realizados neste tempo.

Os experimentos para análise da variação de V_0 em função da concentração de substrato e estimativa dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) da exo-PG do extrato

bruto foram realizados utilizando como substrato pectina cítrica DE 26 % dissolvida em tampão acetato de sódio 0,2 mol.L⁻¹, pH 4,0 em concentrações que variaram de 0,4 até 8 mg/mL.

5.17. Termodinâmica da termoinativação irreversível

A análise termodinâmica da exo-PG pura seguiu o proposto por Saquib et al. (2010, 2012), por meio da determinação de açúcares redutores pelo método de Miller (1959).

5.17.1. Caracterização quanto à temperatura ótima, cálculo de E_a e Q₁₀

Os experimentos para determinação da temperatura ótima de atividade foram executados como descrito no item 5.11. Os resultados foram representados em um gráfico de Arrhenius: logaritmo natural (ln) da atividade em U/mL vs 1000/T na qual T corresponde à temperatura absoluta em Kelvin. Realizamos um ajuste linear para obter o valor da inclinação da porção descendente. A energia de ativação (E_a) em kJ.mol⁻¹ foi calculada a partir do gráfico acima descrito pela equação 2, na qual R corresponde à constante geral dos gases, 8,314 J. K⁻¹.mol⁻¹:

$$E_a = -(\text{inclinação} \cdot R) \quad \text{equação 2}$$

Por outro lado, o coeficiente de temperatura (Q₁₀) foi calculado pela equação 3.

$$\ln Q_{10} = \frac{E_a \cdot 10}{RT^2} \quad \text{equação 3}$$

A temperatura ótima em graus Celsius foi calculada pela equação 4, na qual “x” é o ponto de interseção das retas ascendente e descendente do gráfico de Arrhenius.

$$T_{\text{ótima}} = \left(\frac{1000}{x} \right) - 273 \quad \text{equação 4}$$

5.17.2. Parâmetros termodinâmicos da desnaturação térmica irreversível

A enzima foi incubada a diferentes temperaturas (50, 60, 70 e 80 °C) por diferentes períodos (10 até 150 min.). Depois de transcorrido o tempo, a amostra foi colocada em banho de gelo e posteriormente mantida *overnight* a 4 °C para que as estruturas secundária e terciária se estabilizassem e que qualquer desdobramento reversível fosse refeito (SAQUIB et al., 2012). Os cálculos dos parâmetros foram realizados como descrito abaixo:

I. Determinação do k_d

Para cálculo da constante de primeira ordem da taxa de desnaturação k_d foi confeccionado um gráfico de $\ln$ atividade residual vs o tempo (min.) para cada temperatura de incubação. Realizou-se o ajuste linear de cada curva para cálculo do valor da inclinação, simbolizado por k_d (min^{-1}).

II. Tempo de meia-vida $T_{1/2}$ (min.)

O tempo de meia-vida foi estimado conforme descrito na equação 5

$$T_{1/2} = \ln \frac{2}{k_d} = \frac{0,693}{k_d} \quad \text{equação 5}$$

III. Energia de ativação da desnaturação térmica $E_{a(d)}$ (kJ.mol^{-1})

Foi construído um gráfico de $\ln k_d$ vs. $1000/T$, sendo a $E_{a(d)}$ calculada pela equação 6:

$$E_{a(d)} = -(\text{inclinação} \cdot R) \quad \text{equação 6}$$

IV. Entalpia de ativação da desnaturação térmica ΔH_D^* (kJ.mol^{-1})

A entalpia de ativação da desnaturação térmica foi estimada pela equação 7:

$$\Delta H_D^* = E_{a(d)} - RT \quad \text{equação 7}$$

V. Energia livre de Gibbs de ativação da desnaturação térmica ΔG_D^* (kJ.mol^{-1})

A energia livre de ativação da desnaturação térmica irreversível foi estimada pela equação abaixo, na qual k_b é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$) e h a constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J.s}$):

$$\Delta G_D^* = -RT \times \ln \frac{(k_d \times h)}{(k_b \times T)} \quad \text{equação 8}$$

VI. Entropia de ativação da desnaturação térmica ΔS_D^* ($\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)

A entropia de ativação da desnaturação térmica foi estimada pela equação 9:

$$\Delta S_D^* = \frac{(\Delta H_D^* - \Delta G_D^*)}{T} \quad \text{equação 9}$$

5.18. Sequenciamento parcial da exo-poligalacturonase purificada por espectrometria de massa

As amostras obtidas da HIC foram preparadas e aplicadas em gel de SDS-PAGE 10 %, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* G-250. A banda foi cortada utilizando uma navalha nova, colocada em tubo falcon e enviada para o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), em Campinas (SP), para as análises de espectrometria de massas, em colaboração com o Dr. André Ricardo de Lima Damásio. No CTBE, as amostras foram descoradas, reduzidas com DTT e alquiladas com iodoacetamida antes da clivagem com tripsina.

Utilizando os dados de MS e MS/MS e o Mascot, um site de banco de dados para a interpretação dos espectros de massa, as amostras foram identificadas, com os parâmetros de tolerância da massa dos peptídeos de $\pm 0,02$ Da e de tolerância da massa do fragmento de $\pm 0,5$ Da. O instrumento usado foi MALDI-TOF-TOF.

5.19. Identificação dos produtos da hidrólise por eletroforese capilar

Os oligossacarídeos liberados pela ação enzimática da exo-PG foram derivatizados com ácido 1,3,6-trissulfônico 8-aminopireno (APTS) por aminação reductiva. As reações enzimáticas ocorreram por até 12 h e utilizaram como substrato o ácido poligalacturônico. A eletroforese capilar dos produtos gerados foi feita em P/ACE MQD (Beckman Coulter) com detecção de fluorescência induzida por laser, utilizando um capilar de sílica fundida (50 μm de diâmetro) como coluna de separação. A emissão foi coletada através de um filtro na faixa de 520 nm. Esse experimento também foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. André Ricardo de Lima Damásio do CTBE, em Campinas, SP.

5.20. Aplicação do extrato enzimático para a extração de sucos

Foi testada a eficiência do extrato bruto contendo Exo-PG na extração de sucos da polpa de maçã, uva e laranja. Para esta técnica foi utilizado o protocolo otimizado de Santi (2005): as frutas foram selecionadas, lavadas e picadas (laranja e maçã) ou esmagadas (uvas). As uvas esmagadas foram mantidas a 50 °C por 15 minutos e as maçãs picadas por 15 minutos em contato com ar, para a destruição de polifenóis. A cada preparo foi adicionado extrato bruto enzimático contendo 5 U/g de polpa. Os preparos foram diluídos em tampão acetato 20 mmol.L⁻¹, pH 5,0 até um volume que cobria a mistura de fruta + extrato enzimático. Ao controle foi adicionado apenas tampão. O conteúdo será incubado por 5 h a 37 °C sob agitação.

A obtenção do suco ocorrerá de modo diferente ao mencionado por Santi (2005): o material foi prensado e filtrado em náilon. Foi medido o conteúdo líquido obtido e a turbidez foi analisada visualmente.

5.21. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Os testes de hidrólise foram realizados com a pectinase presente no extrato bruto e a forma pura, com o objetivo de otimizar a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar e portanto, a pectinase em questão foi usada como uma enzima complementar na sacarificação realizada pelas celulasas. As celulasas foram fornecidas pelo colega de laboratório Marcello Bertoldi, tendo sido obtidas de Cultivo Submerso do fungo termofílico *Mycelyophthora heterothallica*.

A hidrólise enzimática ocorreu por 72 h a 50 °C sob agitação. A mistura de reação consistiu de: 0,3 g de bagaço lavado e triturado, 0,02 % de azida sódica (antimicrobiano), 60 unidades de celulasas e 60 unidades de enzima pectinase (do extrato bruto e/ou pura, sendo o volume final completado para 20 mL com tampão acetato 0,1 mol.L⁻¹ pH 5,0.

A determinação de açúcares redutores totais se deu pelo método proposto por Nelson (1944). Os monossacarídeos xilose e glicose foram quantificados por cromatografia de íons DIONEX executada no Laboratório Bioquímica e Microbiologia Aplicada da UNESP de São José do Rio Preto em colaboração com a Profa. Dra. Eleni Gomes e sua equipe. Também foi feito um controle no qual a amostra foi trocada por tampão e o mesmo não apresentou ART.

5.22. Determinação da composição de material lignocelulósico (lignina solúvel e insolúvel, celulose e hemicelulose) do bagaço de cana.

Foram feitas duas réplicas para a determinação da composição do material lignocelulósico (lignina solúvel e insolúvel, celulose e hemicelulose) do bagaço de cana, sendo que para cada amostra foi recortado, identificado e pesado um papel filtro e deixado na estufa por 24 h. Também foram pesadas e identificadas placas de Petri, sendo que em cada placa, já identificada, pesamos 0,4 g de bagaço. Após isso, cada placa com o bagaço foi posta em estufa a 60 °C por 24 h até atingir peso constante (peso seco). Na sequência pesou-se 0,3 g desse bagaço seco e foi preparada solução de ácido sulfúrico a 72 %. O bagaço e o ácido foram colocados juntos em dois tubos de hidrólise (cada tubo contendo 3 mL de ácido e 0,3 g de bagaço) e colocados no banho de hidrólise com agitação de 150 rpm a 30 °C por 30 minutos.

Após o banho o conteúdo de cada tubo foi transferido para Erlenmeyers de 250 mL e adicionou-se 84 mL de água destilada. Todos os Erlenmeyers foram autoclavados por 1 hora a 121 °C. Seu conteúdo foi filtrado a vácuo (filtro com poros de 14 µm), sendo o filtrado coletado para análise em espectrofotômetro a 240 nm. O papel filtro e o bagaço retidos foram retirados e colocados em cadinhos pré-identificados e pesados (antes e após serem colocados em mufla por 1 hora a 500 °C). Cada cadinho foi colocado na estufa a 105 °C por 12 h até atingir peso constante. Após pesado o cadinho retirado da estufa com o papel filtro e o bagaço seco, foram colocados na mufla por 4 h a 500°C e ao final do processo foram pesados novamente.

5.23. Determinação da composição de material lignocelulósico (celulose e hemicelulose)

Para determinação da celulose e hemicelulose do material lignocelulósico foi utilizada a fração líquida usada na quantificação da lignina insolúvel e as amostras obtidas na hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar . As amostras foram analisadas em cromatografia de íons (DIONEX) no Laboratório acima citado. Para tal, essas foram diluídas em tampão acetato 0,1 M e pH 5,0 para diminuir a acidez das amostras já que fora utilizado ácido sulfúrico 72 % na preparação das mesmas. Para a quantificação da celulose e hemicelulose foi feita uma reta de calibração de glicose e xilose.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Curva de produção de exo-PG e análises eletroforéticas do extrato bruto

A formação de produto pela exo-PG foi linear até um tempo de reação de quatro minutos, sendo o tempo utilizado para a incubação. A curva de produção mostra que o pico de produção da enzima estudada se deu com 96 horas de fermentação (figura 7). Pelas análises eletroforéticas por zimograma (figura 8) observa-se a presença de apenas uma isoforma de exo-PG. Vale ressaltar que as bandas correspondentes à exo-PG das figuras 7a e 7b encontram-se em posições distintas uma vez que o zimograma foi feito pela equipe da USP/Ribeirão Preto, utilizando um sistema de eletroforese com dimensões e concentração de poliacrilamida diferentes, por isso observa-se uma diferença na migração.

O zimograma se mostrou uma técnica com baixa reprodutibilidade e após serem testados vários protocolos, decidiu-se não dar continuidade a esta técnica. O único zimograma bem sucedido se encontra representado na figura 8b.

Figura 7. Curva de produção de exo-PG do fungo *Rhizomucor pusillus* (três réplicas). Cada ponto representa a média de produção e a linha vertical o desvio padrão para cada tempo de fermentação.

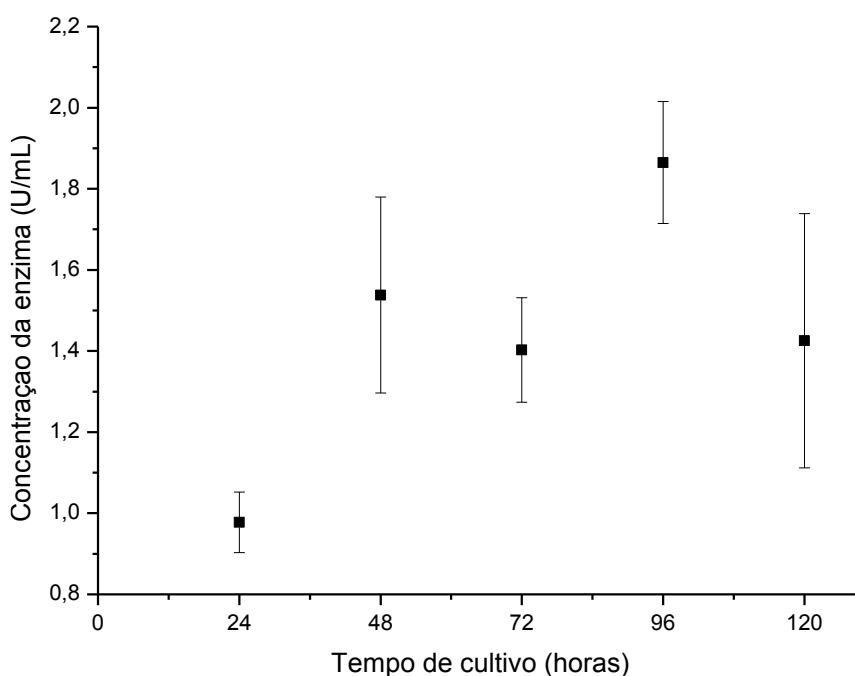
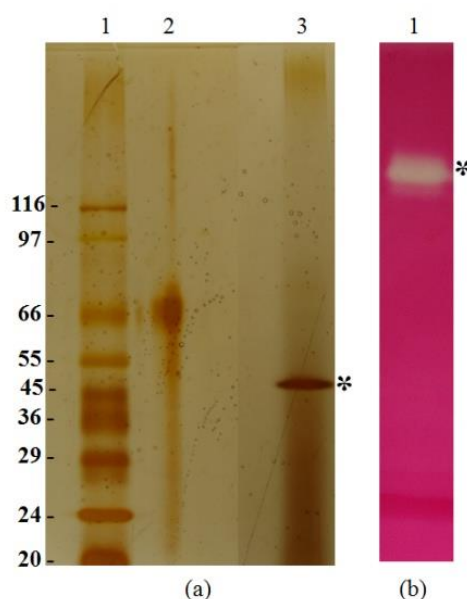


Figura 8. Em (a) Gel SDS-PAGE (gel de corrida 8% e gel de empilhamento 5%): 1 (Perfil dos marcadores de massa molecular - valores em kDa), 2 (Perfil da soroalbumina bovina), 3 (Perfil do extrato bruto), * (banda corresponde a exo-PG). Em (b) Gel PAGE (gel de corrida 8% e gel de empilhamento 5%): 1 (perfil do extrato bruto), (*) banda correspondente à exo-PG.



6.2. Estimativa da massa molecular da exo-PG

Para a estimativa da massa molecular da possível exo-PG em condições desnaturantes, foi feito um ajuste (figura 9) com base nos resultados obtidos com a técnica SDS-PAGE, ilustrada na figura 8a. Por meio de regressão linear foi calculada a equação da reta ilustrada na figura 8: $y = 1,99 - 0,809x$, onde y corresponde à migração relativa da possível banda da pectinase no gel e x ao log massa molecular desta proteína. Uma vez que a possível banda da pectinase teve migração relativa de 0,63 no gel, a massa molecular desta é estimada em aproximadamente 47 kDa.

A massa molecular da conformação nativa também foi estimada, porém por cromatografia de filtração em gel em Sephadex G-75 como sendo de aproximadamente 43,5 kDa por meio da reta do logaritmo da massa molecular dos marcadores de massa molecular vs. o coeficiente de partição dos mesmos (figura 10). As estimativas por ambos os métodos são concordantes dentro da margem de erro.

Figura 9. Gráfico de Fischer (DENNISON, 2002) da migração relativa (RF) dos marcadores de massa molecular no gel de poliacrilamida da figura 8 vs. o logaritmo da massa molecular desses marcadores.

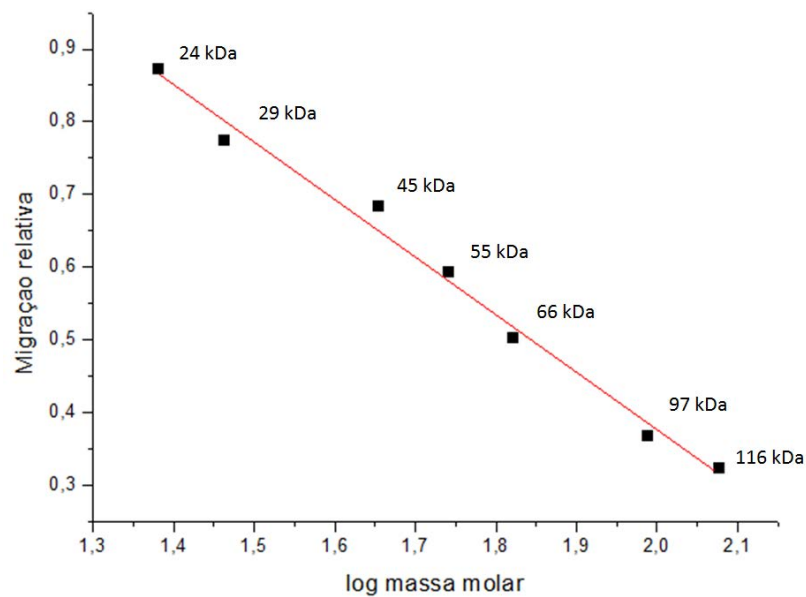
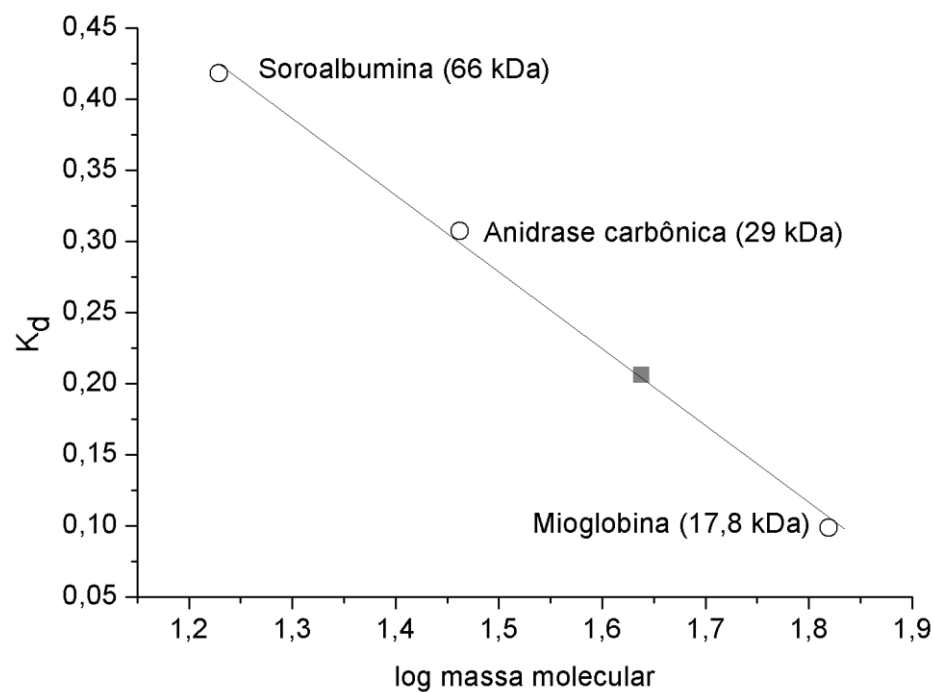


Figura 10. Gráfico de Fischer do coeficiente de distribuição K_d obtido por cromatografia de filtração em gel em Sephadex G-75 versus o logaritmo da massa molecular dos marcadores de massa molecular. O quadrado cinza representa o ponto correspondente à pectinase de *R. pusillus*.



6.3. Efeito de cátions na atividade da exo-PG parcialmente purificada

Com a filtração em gel em resina Sephadex G-50 foi possível remover grande parte dos contaminantes (figura 11), além dos íons presentes na solução nutritiva usada durante o CSm, dos quais alguns mostraram-se potentes inibidores da exo-PG, como é o caso do Fe^{+3} , Mn^{+2} , Mg^{+2} (tabela 4). Deste modo foi possível observar o efeito de diferentes cátions na atividade da exo-PG sem a interferência de demais íons/contaminantes.

O cátion Na^+ não influenciou significativamente na atividade da exo-PG; alguns cátions como Mg^{+2} , Fe^{+3} , Ba^{+2} e Mn^{+2} mostraram-se potentes inibidores da enzima em estudo; já outros cátions como Al^{+3} e Ca^{+2} mostraram-se ativadores da exo-PG, merecendo destaque o efeito do Ca^{+2} que atua como cofator da exo-PG, aumentando sua atividade em 70 %. Gomes et al. (2009) já haviam relatado um aumento de 10-30 % na atividade da exo-PG de *Penicillium viridicatum* na presença de Ca^{+2} . Todos estes dados estão representados na tabela 4. A exo-PG de *Aspergillus sojae* (DOGAN; TARRI, 2008) não foi afetada pelo cálcio, e sim pelo zinco, que produziu um acréscimo de apenas 12 % da atividade.

Deste modo as análises de rendimento do processo de purificação e a posterior caracterização da enzima já pura foram realizados com adição de CaCl_2 10 mM na mistura de reação, a fim de fornecer à enzima o cofator e condições ideais para a catálise.

Figura 11. Perfil de eluição da filtração em gel do extrato enzimático de *R. pusillus* aplicado a uma coluna GE XK-16/100 com Sephadex G-50. Valores de absorbância em 280 nm (linha preta) e valores de absorbância em 540 nm após a quantificação de açúcares redutores (linha azul).

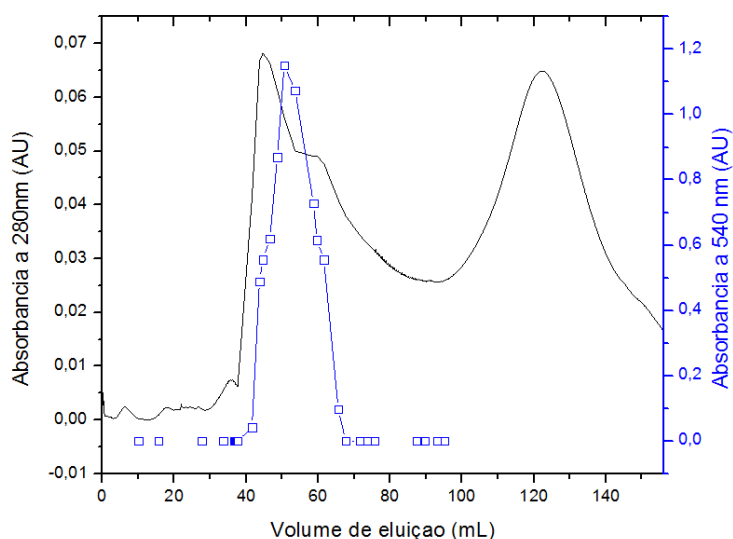


Tabela 3. Efeito de cátions (concentração final de 10 mmol.L⁻¹) sobre a atividade relativa (%) da exo-PG parcialmente purificada. Os asteriscos assinalam diferenças significativas entre as médias pelo teste t de Student (p<0,05).

Íons 10 mM	Média (%)		Desvio pa- drão (%)
Controle	100,0	±	0,8
NaCl	95,2	±	8,0
MgCl ₂	34,1*	±	3,5
AlCl ₃	125,4*	±	7,8
KCl	96,2*	±	0,7
FeCl ₃	0,0*		-
CaCl ₂	170,3*	±	0,8
BaCl ₂	24,5*	±	6,5
MnCl ₂	0,0*		-

6.4. Purificação da exo-PG

Empregou-se uma faixa de saturação de 85 – 95 % de sulfato de amônio, sendo que com a saturação de 95 % de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ foi possível obter a exo-PG praticamente livre de contaminantes, como podemos observar nas análises eletroforéticas da figura 12. Sais cosmotrópicos, como o empregado na precipitação, aumentam a entropia do sistema, uma vez que sequestram as moléculas de água que formavam os clatratos possibilitando a interação entre grupos hidrofóbicos, o que leva à precipitação da proteína (DENNISON, 2002)

No entanto, ao contrário do que era esperado, a proteína de estudo não foi precipitada na presença de 95 % de sulfato de amônio, podendo ser encontrada praticamente livre de contaminantes no sobrenadante. Isso provavelmente se deu pela ausência ou ocorrência pequena de resíduos hidrofóbicos na superfície de termozimas, os quais geralmente se encontram no interior destas biomoléculas (PACK ;YOO, 2005), ou por interferência de oligossacarídeos ligados à enzima. Assim, devido à baixa interação entre resíduos hidrofóbicos a exo-PG em estudo não precipitou, o que proporcionou o seu isolamento no sobrenadante.

A técnica empregada possibilitou a purificação da enzima por meio de apenas uma técnica rápida e que garante um resultado com alto rendimento (tabela 5), além de possuir um baixo custo operacional, mostrando-se deste modo altamente viável

para a purificação da enzima. O grau de pureza e de rendimento do sobrenadante obtido com uma saturação de 95 % de sal foram considerados suficientes para dar continuidade aos estudos de caracterização bioquímica, cinética e termodinâmica.

Para a identificação da composição da *exo*-PG por MALDI-TOF foi necessário um grau de pureza maior, o que foi obtido por meio da cromatografia de interação hidrofóbica (figura 12d), na qual a proteína foi eluída entre os volumes 33,6 e 34,6 mL (figura 13). O monitoramento do processo de purificação está descrito na tabela 5.

Figura 12. Géis de poliacrilamida na presença de SDS SDS-PAGE (gel de corrida 10% e gel de empilhamento 5%), em (a) 85 % de sulfato de amônio, (b) 90 % de sulfato de amônio e (c) 95 % de sulfato de amônio: 1 (Perfil dos marcadores de massa molecular - valores em kDa), 2 (Perfil do sobrenadante da precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), 4 (Perfil do *pellet* da precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), * (banda corresponde a *exo*-PG). Em (d) resultado da HIC: 1 (Perfil dos marcadores de massa molecular - valores em kDa), 2 (perfil do resultado da HIC), * (banda corresponde a *exo*-PG).

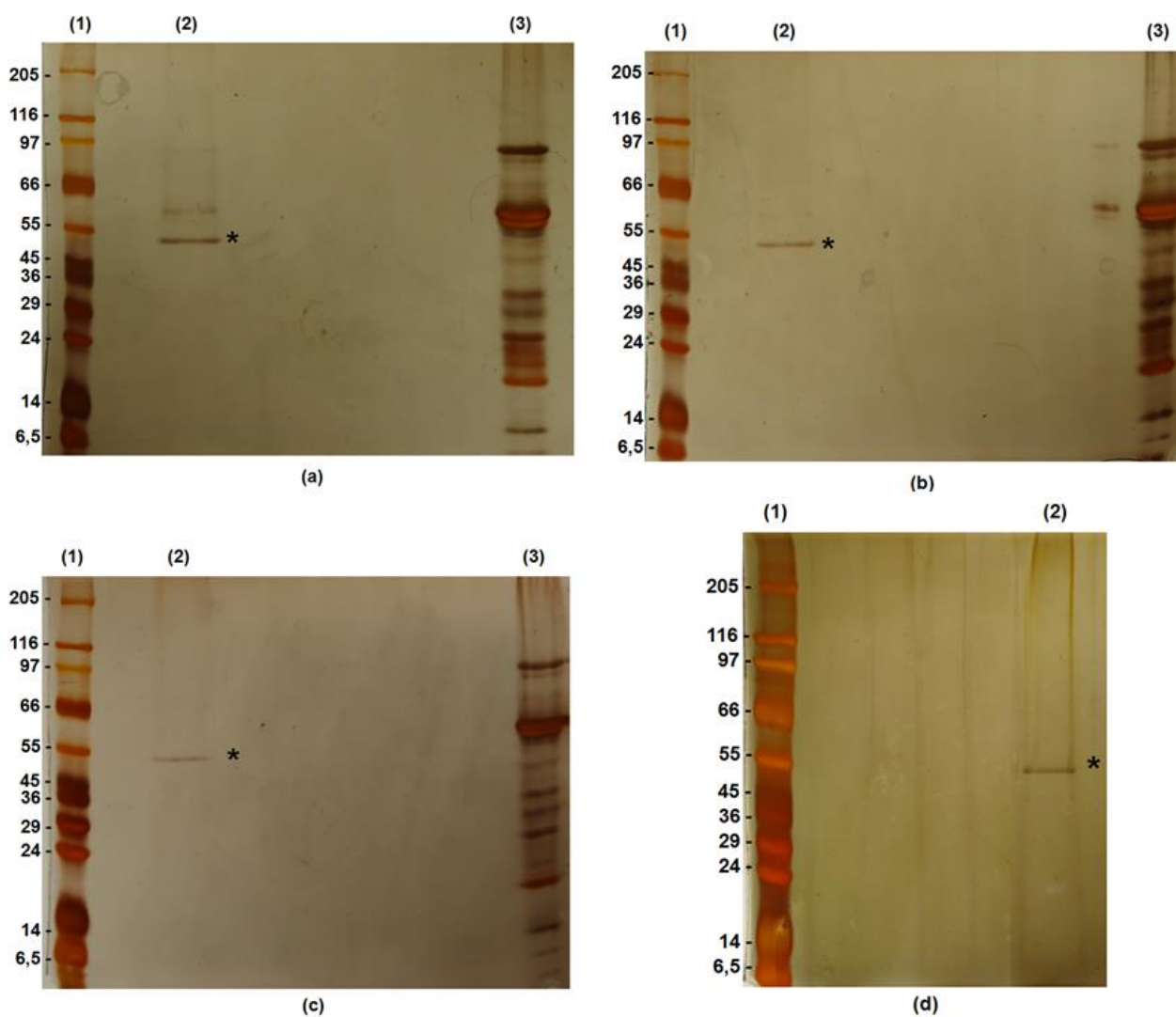


Figura 13. Perfil de eluição da cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). O asterisco indica o volume de eluição da enzima.

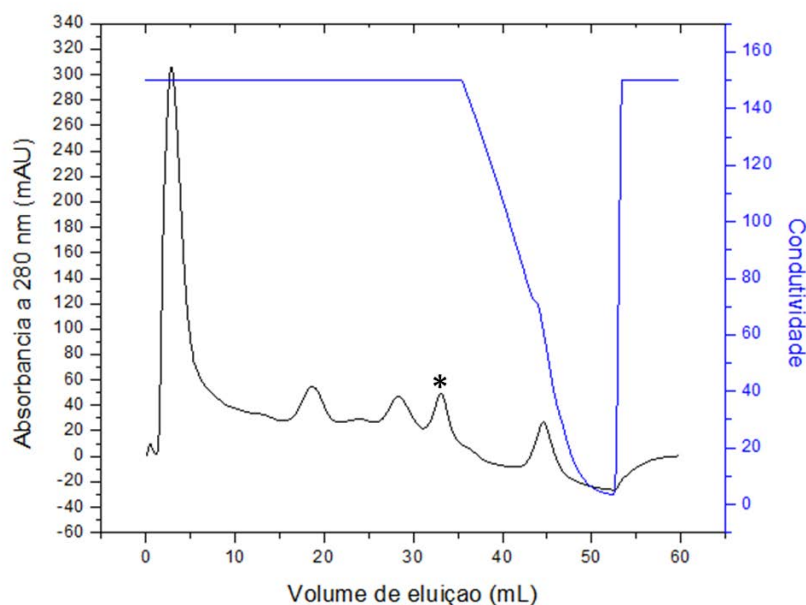


Tabela 4. Tabela de purificação. Para o cálculo do rendimento considerou-se a condição inicial (extrato bruto) com rendimento 100 %. Para o cálculo do fator de purificação considerou-se a condição inicial (extrato bruto) com fator de purificação 1. A condição *salting-out* se refere ao sobrenadante obtido com uma saturação de 95 % de sal.

Condição	Volume (mL)	U total	mg total	Rendimento (%)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Extrato bruto	10	170	1,1	100	149	1
Salting-out	40,8	124,2	0,5	73,5	223,4	1,4
HIC	15	25,2	0,15	14,9	171	1,2

6.5. Caracterização bioquímica da *exo*-PG

O pH ótimo da *exo*-PG foi de 4,5 (para a enzima presente no extrato bruto) e de 4,0 (para a enzima pura) (figura 14a). Já a temperatura ótima foi de 60 °C para a *exo*-PG do extrato bruto e pura (figura 15a), valor este compatível para termozimas, na faixa de 60 a 80 °C (VIEILLE ; ZEIKUS, 2001).

Na figura 14b notamos que a *exo*-PG do extrato bruto possui estabilidade em valores de pH que variam de 8 a 9,5, valores estes não encontrados para a *exo*-PG pura, que se mantém estável em pHs que variam de 3,5 a 6,5, faixa em que se encontra o seu pH ótimo. É possível que proteases presentes no extrato bruto possuam atividade em pHs mais ácidos, o que levaria à proteólise da *exo*-PG do extrato bruto, que

passa a apresentar atividade significativa em pHs mais altos (8 a 9,5), os quais não seriam as condições ideais das proteases. No entanto, após a purificação as proteases, juntamente com os demais contaminantes, teriam sido removidas e a exo-PG mostrou estabilidade em pHs que variam de 3,5 a 6,5.

A termozima em estudo se manteve estável incubada por 1 hora na ausência de substrato até 60 °C, mantendo consideravelmente sua atividade residual (figura 15b). A mesma figura nos mostra ainda uma característica interessante acerca das enzimas termofílicas, como a exo-PG: um acréscimo da temperatura leva a um aumento considerável da atividade residual da enzima até a temperatura de máxima estabilidade (60 °C), após a qual a enzima é desnaturada.

Segundo Shiraki et al. (2001) a alta rigidez das enzimas termofílicas decorrentes da estabilidade de enovelamento requer uma alta temperatura de atividade (em geral, maior que 40 °C) para promover uma movimentação térmica e o aumento da flexibilidade estrutural que é essencial para a catálise.

A exo-PG pura também mostrou alta afinidade por substratos com baixa metilação (figura 16), como pectina cítrica DE 26 % já que as poligalacturonases hidrolisam as ligações α (1 $\rightarrow$ 4) entre dois resíduos de ácido galacturônico não metilados (PEDROLLI et al., 2009).

Figura 14. Caracterização bioquímica da exo-PG do extrato bruto (●) e pura (○): (a) Variação da atividade da exo-PG em diferentes valores de pH; (b) Atividade residual da exo-PG quando incubada a diferentes pHs por 24 horas a temperatura ambiente, na ausência de substrato - para o cálculo da atividade residual usou-se como parâmetro uma amostra controle preparada pela mistura (1:1) da solução enzimática em água, incubada a temperatura ambiente por 24hs na ausência de substrato (controle = 100%); Nos gráfico são representados as médias (pontos) e desvios padrões (barras).

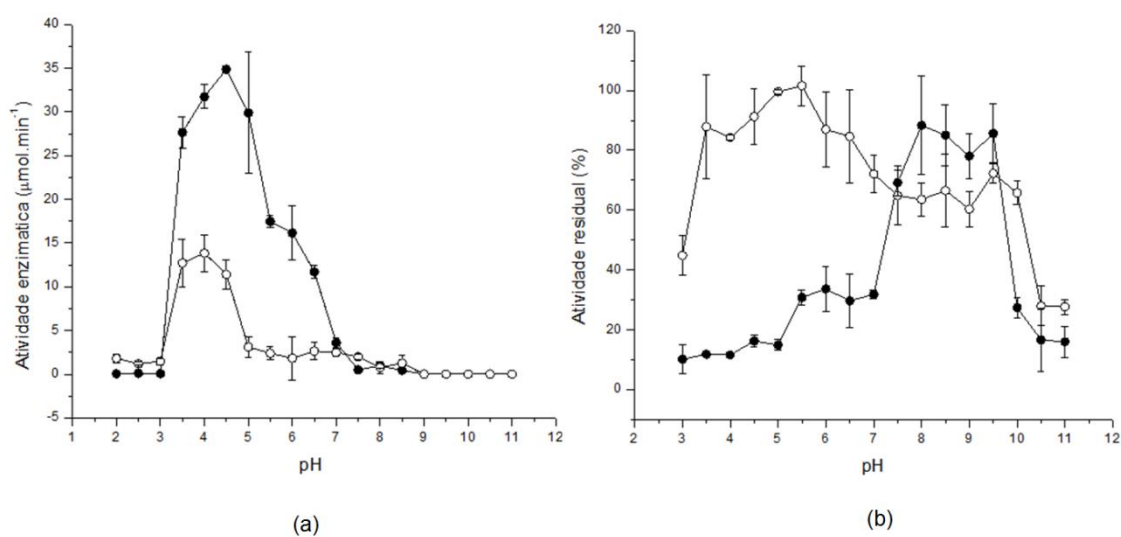


Figura 15. Caracterização bioquímica da exo-PG do extrato bruto (●) e pura (○): (a) Variação da atividade da exo-PG em diferentes valores de temperatura; (b) Atividade residual da exo-PG quando incubada a diferentes temperaturas por 1 hora, na ausência de substrato - para o cálculo da atividade residual usou-se como parâmetro uma amostra controle que não foi incubada a diferentes temperaturas (controle = 100%). Nos gráfico são representados as médias (pontos) e desvios padrões (barras).

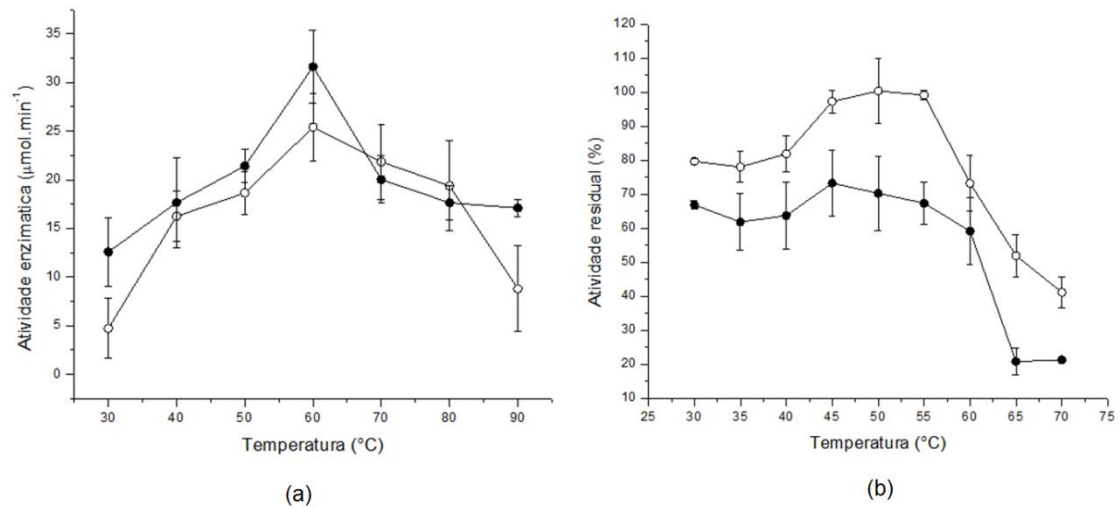
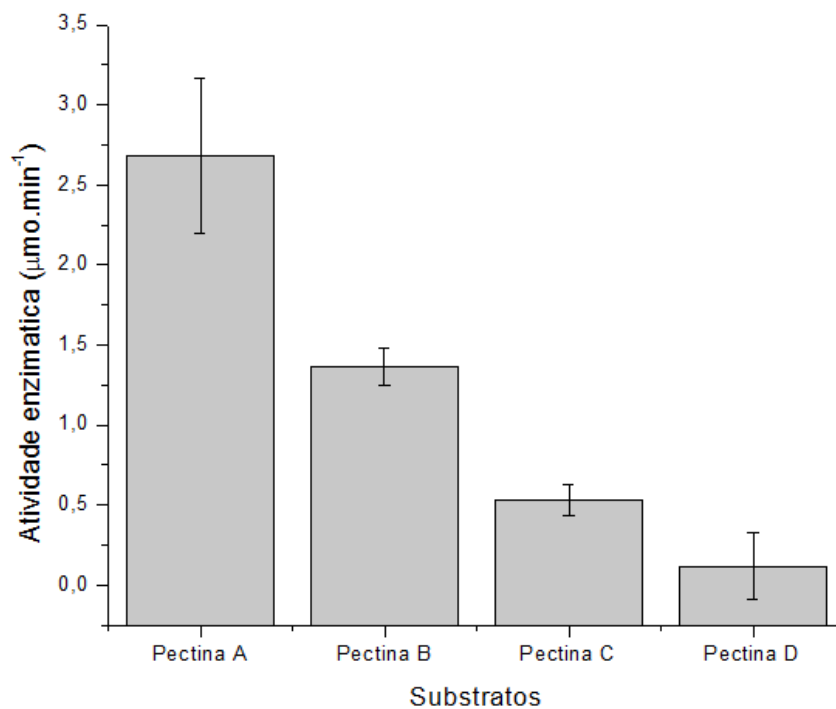


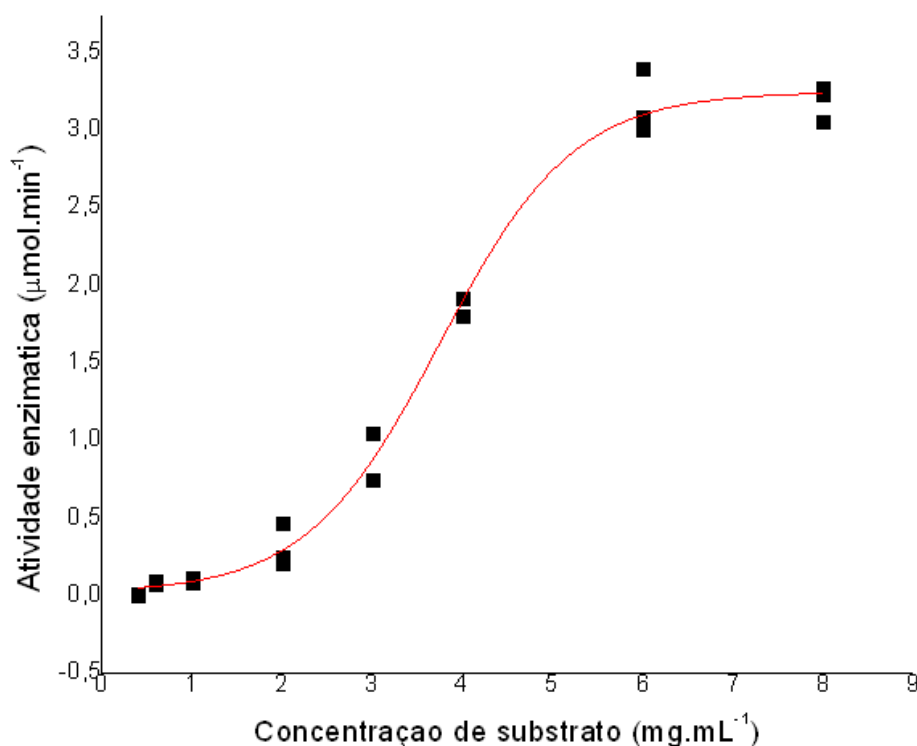
Figura 16. Preferência da exo-PG pura por quatro diferentes substratos: (A) pectina cítrica DE 26 e (B) 92 %; (C) pectina de maçã; (D) pectina cítrica Genu 8001 DE 30 %. As barras representam a média de atividade enzimática e as barras os desvios padrão.



6.6. Estudo cinético da exo-PG

A figura 17 representa a variação da atividade enzimática em diferentes concentrações de substrato, por meio da dispersão dos valores obtidos com as réplicas. O perfil obtido foi diferente do esperado e devido à escassez de dados na literatura não foi possível compará-lo. Acreditamos que isso se deve ao substrato utilizado ser um polímero complexo e não um substrato sintético, sendo estes últimos os ideais para as análises cinéticas. Em nossa opinião a alternativa de se tratar de uma enzima alostérica devido ao formato da curva não faz sentido, pois uma enzima monomérica não exibiria cooperatividade. Assim sendo, a constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima não foram estimadas.

Figura 17. Gráfico de Michaelis-Menten para a exo-PG pura de *R. pusillus*



6.7. Termodinâmica da termoinativação irreversível

Por meio da curva de Arrhenius representada na figura 18 foi possível estimar a temperatura ótima e a energia de ativação da exo-PG (E_a). O coeficiente de temperatura (Q_{10}), que representa o aumento da velocidade a cada 10 graus de elevação da

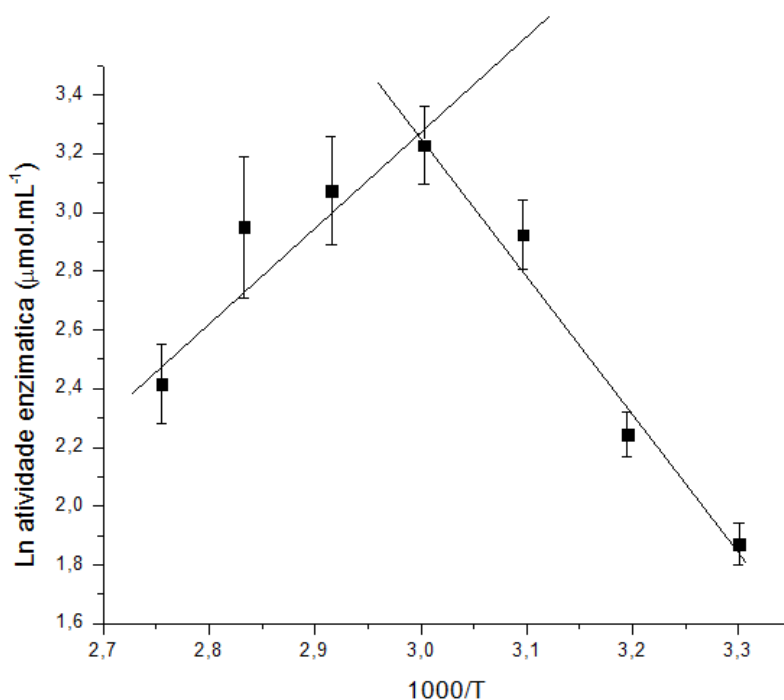
temperatura também foi estimada em diferentes temperaturas. Os parâmetros mencionados se encontram na tabela 5.

Tabela 5. Energia de ativação (E_a), temperatura ótima e coeficiente de temperatura (Q_{10}) estimados com base na figura 18.

Parâmetro	
E_a (kJ.mol ⁻¹)	15,1 ± 3,8
Q_{10}	1,57 (50 °C); 1,53 (60 °C);
	1,50 (70 °C); 1,46 (80 °C)
Temperatura ótima (°C)	61,1

A baixa energia de ativação da enzima (15,1 kJ.mol⁻¹) indica que a exo-PG deve superar uma pequena barreira energética para hidrolisar o substrato, um valor inferior aos reportados por Saquib et al. (2010) para duas endoglicanases de *Aspergillus fumigatus*, e o valor do coeficiente de temperatura Q_{10} a 50 °C também é intermediário em relação aos determinados para essas enzimas (1,80 e 1,46) nas mesmas condições. Os valores de Q_{10} mostram uma diminuição progressiva conforme se eleva a temperatura, reflexo da desnaturação térmica.

Figura 18. Gráfico de Arrhenius para o cálculo da energia de ativação (E_a) e temperatura ótima da exo-PG pura. No gráfico são representados as médias (pontos) e desvios padrões (linhas verticais).



A figura 19 mostra o efeito do tempo de incubação em diferentes temperaturas (de 50 a 80 °C) na atividade da exo-PG. Os demais parâmetros termodinâmicos encontram-se descritos na tabela 6. Na comparação com resultados disponíveis na literatura observa-se que o tempo de meia-vida foi muito maior do que o descrito para a exo-PG de *Thermomucor indicae-seudaticae* (MARTIN, 2010), que foi de 161,2 min e 58,3 min a 55 °C para cultivo submerso e sólido, repectivamente e também superior à relatada para a exo-PG de *Aspergillus sojae* (DOGAN ; TARI, 2008) a 80 °C (19,8 min.), indicando uma alta termoestabilidade da exo-PG em estudo. A mesma observação é válida para a endoglicanase de *A. fumigatus* obtida por cultivos diferentes (Saqib et al., 2010), com 224 e 330 minutos a 50 °C. Bhatti et al. (2013) reportaram uma meia-vida de 87 min. para beta-glicosidase de *Fusarium solani* a 70 °C, menor do que o valor obtido neste trabalho para a mesma temperatura.

Figura 19. Gráfico de primeira ordem do efeito da temperatura na atividade da exo-PG: 50 °C (■); 60 °C (●); 70 °C (▲) e 80 °C (▼). No gráfico são representados as médias (pontos) e desvios padrões (linhas verticais).

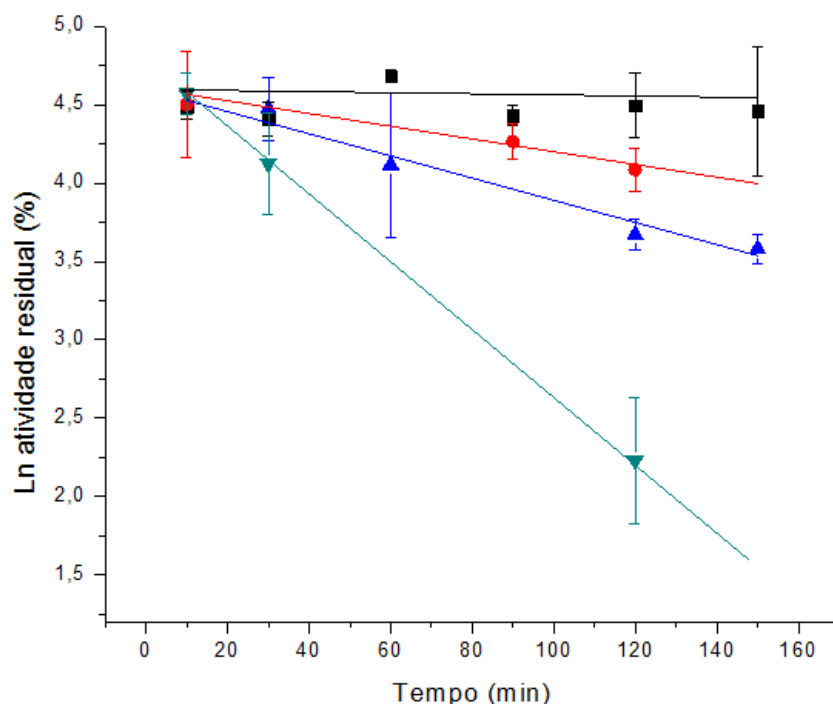


Figura 20. Gráfico de Arrhenius de primeira ordem para o cálculo da energia de ativação da desnaturação térmica ($E_{a(d)}$) da exo-PG pura.

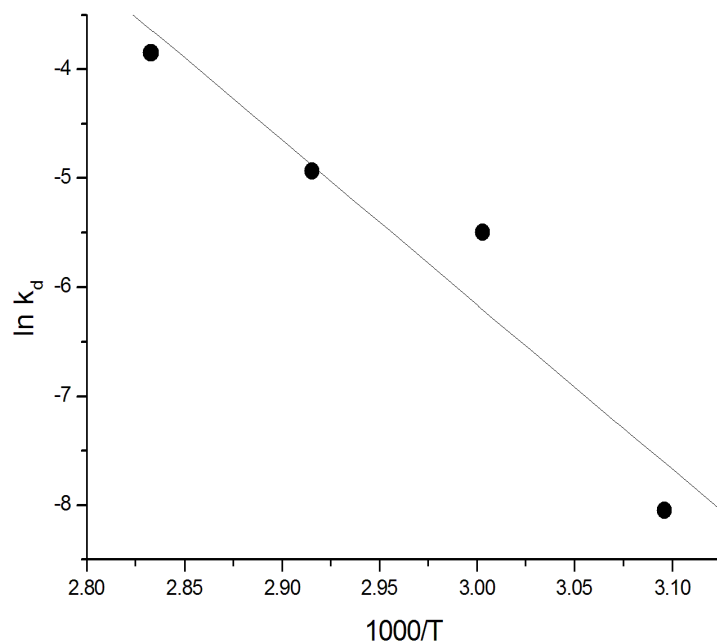


Tabela 6. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da termoinativação irreversível.

Temperatura (°C)	Temperatura (K)	k_d (min. ⁻¹)	$T_{1/2}$ (min.)	ΔH_d (kJ.mol ⁻¹)	ΔG_d (kJ.mol ⁻¹)	ΔS_d (J.mol.K ⁻¹)
50	323	0,0003	2310,0	124,7	47,8	238,2
60	333	0,0041	169,0	124,6	49,3	226,1
70	343	0,0072	96,3	124,5	50,9	214,7
80	353	0,0213	32,5	124,4	52,4	203,9

A energia de ativação da desnaturação térmica ($E_{a(d)}$) calculada através da figura 20 ($125,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$) representa a barreira energética necessária para levar a enzima ao estado desnaturado irreversível no equilíbrio $N \leftrightarrow D$ entre os estados nativo e desnaturado, respectivamente. Saquib et al. (2010) reportaram valores de 154.7 e 114.3 kJ.mol^{-1} para endoglicanase de *A. fumigatus* obtida por cultivo em estado sólido e submerso, respectivamente, enquanto Dogan e Tari reportaram um valor mais elevado de 286,2 kJ.mol^{-1} para a exo-PG de *Aspergillus sojiae*.

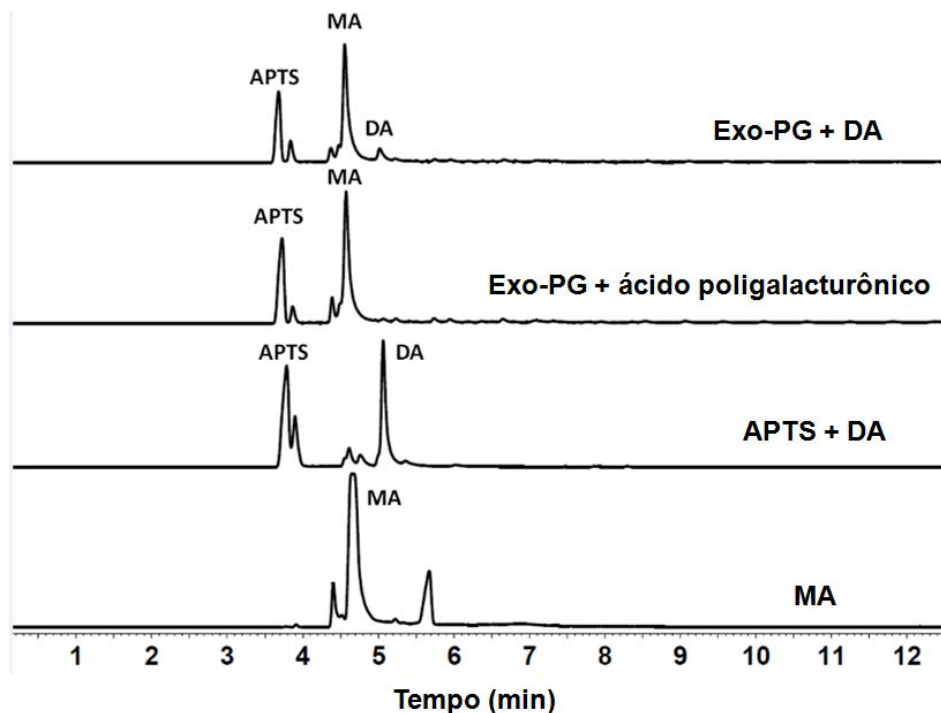
Os valores de ΔH_d são intermediários em relação aos relatados por Saquib et al. (2010) porém inferiores aos 357 kJ.mol^{-1} para endoglicanase de *Aspergillus orizae* (JAVED et al., 2009). A variação positiva da entropia de desnaturação foi acima de 200 $\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$, inferior a resultados de Saquib et al. (2012) para endoglicanase de *A. fumigatus*, na faixa de 400 $\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ e muito diferentes dos valores obtidos por Siddiqui et al. (1997), situados entre - 200 e -210 $\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ e por Batthi (2013) para uma β -glicosidase de *Fusarium solani*, com valores ao redor de -170 $\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$. Em geral a variação da entropia é positiva devido a um aumento na desordem, enquanto baixos valores de ΔS_d sugerem a exposição de cadeias laterais apolares, causando ordenamento das moléculas de água na forma de clatratos ou “gaiolas” (SIDDIQUI et al., 1997).

Em relação à energia livre de Gibbs (ΔG_d), pequenos valores desse parâmetro indicam que o processo, neste caso de desnaturação térmica, ocorrem favoravelmente enquanto que valores altos de ΔG_d , como os encontrados para a exo-PG, mostram uma resistência à desnaturação térmica, e situam-se próximos aos relatados por Saquib et al. (2010).

6.8. Identificação de produtos da hidrólise por eletroforese capilar

A eletroforese capilar dos produtos da hidrólise da exo-PG mostrou um padrão de ação “exo”, nas extremidades da cadeia do substrato, uma vez que foi detectada a liberação de monogalacturonídeos (figura 21).

Figura 21. Perfil da eletroforese capilar dos produtos da hidrólise da exo-PG. No gráfico são representadas as quatro condições: Exo-PG+DA; Exo-PG+ácido poligalacturônico; APTS+DA (padrão) e MA (padrão). APTS (ácido 1,3,6-trissulfônico 8-aminopireno); DA (ácido digalacturônico) e MA (ácido monogalacturônico).



6.9. Análise da exo-PG por espectrometria de massa

A análise da sequência da PG purificada foi realizada por espectrometria de massa, do tipo MALDI-TOF e os fragmentos foram comparados com um banco de dados, sendo obtida uma identidade de 30 % com a PG do fungo *Aspergillus fumigatus*. Os resíduos idênticos estão escritos em vermelho na sequência a seguir, pertencente a *A. fumigatus*. A massa molecular da enzima de *A. fumigatus* é de 38,5 kDa, um pouco abaixo das estimativas feitas por filtração em gel e eletroforese desnaturante para a exo-PG deste trabalho. Pode-se verificar na sequência mencionada um alta quantidade de cisteína e prolina, aminoácidos hidrofóbicos, sugerindo um efeito hidrofóbico.

Figura 22. Resultados do sequenciamento da exo-poligalacturonase de *R. pusillus* por espectrometria de massa. Os resíduos em vermelho correspondem àqueles idênticos com a exo-PG de *Aspergillus fumigatus*.

{MATRIX} Mascot Search Results

Protein View

Match to: [gi|70993186](#) Score: 899
extracellular polygalacturonase [Aspergillus fumigatus Af293]
 Found in search of D:\Usuarios\03abril_Marcelo_CTBE_pectinase.raw

Nominal mass (M_r): 38542; Calculated pI value: 4.22
 NCBI BLAST search of [gi|70993186](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Aspergillus fumigatus Af293](#)
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:
[gi|74671877](#) from [Aspergillus fumigatus](#)
[gi|294956677](#) from [Aspergillus fumigatus A1163](#)
[gi|66849074](#) from [Aspergillus fumigatus Af293](#)
[gi|159125626](#) from [Aspergillus fumigatus A1163](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
 Variable modifications: Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: 30%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MRSVKLFGLA ALGSLGAAAP APSRVSDLTK RSSTCTFTAA SQATESASGC
51 SEIVLDNIEV PAGETLDLSD VDDGTTIVFE GTTTFGYKEW SGPLIRFGGK
101 DITIKQNSGA VIDEGSRWW DGEGTNGGKT KPKFMYAHS EDSTITGLSI
151 KNTPVQAISV QATNLYLIDI TIDNSDGDDN GGHNTDGFDI SESTGVYIRG
201 ATVKNQDDCI AINSGENIEF SGGTCSGGHG LSIGSVGGRD DNTVKNVTIT
251 DSTVTDSANG VRIKTVYDAT GSVSQVTYSN IKLSGITDYG IVIEQDYENG
301 SPTGTPTTGV PITDLTIDGV TGTVESDAVE VYILCGDGGC SDWTWEGVDI
351 TGGEKSSKCE NVPSGASC
  
```

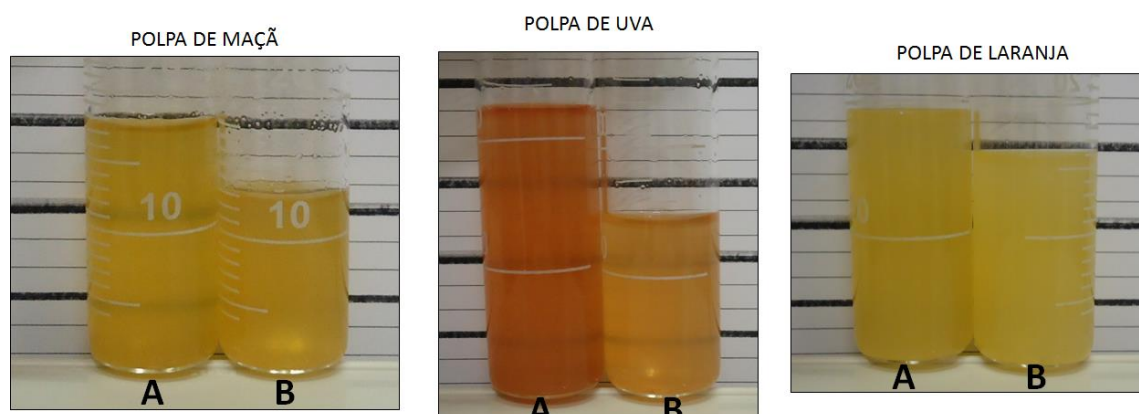
6.10. Extração de sucos de frutas

Os resultados obtidos mostram claramente o aumento do rendimento da extração do suco em relação ao seu controle. Em cada experimento a presença da enzima na forma de extrato enzimático aumentou significativamente o rendimento da extração. Como pode-se observar na tabela 7 e figura 23, a aplicação do extrato enzimático bruto aumentou a extração de suco da polpa devido à degradação da pectina da parede celular vegetal, sendo observado um aumento no volume de suco obtido, sobretudo com a polpa de maçã e uva. Além disso, a aplicação de extrato enzimático reduziu a turbidez do suco das polpas de maçã e uva. É importante salientar ainda que aplicação de extrato enzimático à polpa de uva também aumentou a extração de pigmentos da uva, melhorando as qualidades cromáticas do suco obtido e assim, é de importante aplicação sobretudo na indústria vinícola.

Tabela 7. Volumes (em mL) obtidos durante a extração de suco da polpa de maçã, uva e laranja. Os asteriscos assinalam diferenças significativas entre as médias pelo teste t de Student ($p < 0,05$) para condição, comparando o teste com seu respectivo controle.

Tratamento	Volume médio $\pm$ D.P.
Controle (maçã)	12,2 $\pm$ 0,9
Controle (uva)	9,5 $\pm$ 0,2
Controle (laranja)	15,2 $\pm$ 1,2
Maça + extrato enzimático	18,7* $\pm$ 1,7
Uva + extrato enzimático	16,0* $\pm$ 0,6
Laranja + extrato enzimático	18,0* $\pm$ 0,6

Figura 23. Análise visual do volume e turbidez após a extração de suco das polpas de maçã, uva e laranja. O experimento foi realizado em triplicata, porém aqui estão registrados uma réplica para cada polpa. Em: A= tratamento (polpa+extrato enzimático) e B=controle.



6.11. Determinação da composição química do bagaço e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Os valores encontrados na composição química do bagaço (tabela 8) seguem as proporções relatadas por Hamelink (2005), porém com uma quantidade de lignina menor, fato que pode ser explicado pelas diferentes condições de solo e tratamento no cultivo da cana-de-açúcar utilizada para os experimentos.

A quantidade de açúcares redutores totais (tabela 9) aumentou quando as celulasas são aplicadas juntamente com as pectinases do extrato bruto, porém o mesmo

efeito não foi observado quando as enzimas do complexo celulolítico foram aplicadas com a exo-PG pura. Isso se deve provavelmente à perda de cofatores da exo-PG durante o processo de purificação e também devido à perda de outras pectinases, visto que as pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas pectinolíticas que também atuam em sinergia e aplicação de uma enzima individual pode não ter o resultado esperado.

Tabela 8. Composição química do bagaço de cana-de-açúcar usado nos experimentos.

Composição química	Média (%)	± DP (%)
Lignina ácida insolúvel	17,4	0,8
Lignina ácida solúvel	1,5	0,3
Lignina sem extrativos	18,9	1,1
Celulose	45,1	1,9
Xilana (Hemicelulose)	23,4	0,8

Tabela 9. Determinação de açúcares redutores totais (ART), celulose e xilose liberados com na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Controle (apenas celulase); Exo-PG do extrato (celulase + exo-PG do extrato bruto) e Exo-PG pura (celulase + exo-PG pura). Em * não foi mensurado glicose e xilose pois não foi encontrado aumento em ART.

	Média ART (mg/g bagaço)	DP	Média de glicose (mg/g bagaço)	DP	Média de xilose (mg/g bagaço)	DP
Controle	100,2	12,9	37,3	1,4	6,2	0,6
Exo-PG do extrato	132,3	8,5	45	6,6	13,4	2,2
Exo-PG pura	98,7	13,1	*	*	*	*

7. CONCLUSÕES

A exo-PG pelo fungo *Rhizomucor pusillus* foi obtida em CSm em 96 h e purificada em um único passo de forma eficiente. A enzima mostrou ativação por Cálcio, estrutura monomérica, e em especial a forma purificada tem elevada estabilidade em relação à temperatura e em uma ampla faixa de pH, o que a torna atraente para testes de aplicação na extração de sucos de frutas e na sacarificação de materiais lignocelulósicos que serão executados em próximos projetos. Os testes de aplicação das enzimas do extrato bruto mostraram um aumento da extração de suco e um auxílio no processo de hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, sendo que este não foi observado com a enzima pura.

9. REFERÊNCIAS

< http://www.ippa.info/what_is_pectin.htm> Acesso em 13 de junho de 2014.

ALFENAS, 1998. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Editora UFV: Viçosa.

APPLICHEM. **Biological Buffers**, 2008. Disponível em <http://www.applichem.com/en/products/biochemica/biological-buffer/>. Acesso válido em 19/11/2013.

ARNOLD, F. H.; WINTROD, P. L.; MIYAZAKI, K.; GERSHENSON, A. How enzymes adapt: lessons from directed evolution. **Trends in Biochemical Sciences**, p. 100-106, 2001.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances.**, p.. 355-383, 2000.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRENDA: The Comprehensive Enzyme Information System < <http://www.brenda-enzymes.info/>> Acesso em 05 de junho de 2014.

BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M., BOOM, R. M. Thermozyms and their applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 90, p. 155-186, 2005.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D. dos; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Editora Blucher, p. 365-380, 2010.

CANTERI, H. G., MORENO, L., WOSIACKI, G., SCHEER, A. P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, vol.22, p. 149-157, 2012.

- CARPITA, N. C.; MCCANN M. C.; RALPH, J. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, 2 ed. New York, NY: Wiley Press, 2000.
- CHANG, J. I.; TSAI, J. J.; WU, K. H. Thermophilic composting of food waste. **Biore-source Technology**. v. 97, p.116-122, 2005.
- DEACON, J. W. **Fungal Biology**. 4^a ed. Blackwell Publishing Ltd. 384p., 2005.
- DEMIR N.; ACAR J.; SARIOGLU K.; MUTLU M. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. **Journal of Food Engineering**. p. 275—280, 2001.
- DENNISON, C. **A guide to protein isolation**. Kluwer Academic Publishers, 2002.
- DOGAN, N.; TARI, C. Characterization of three-phase partitioned exo- polygalacturonase from *Aspergillus sojae* with unique properties. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 43-50, 2008.
- ELCOCK, A. H. The stability of salt bridges at high temperatures: implications for hyperthermophilic proteins. **Journal of Molecular Biology**, p. 489-502, 1998.
- FÁGÁIN, C.O. Understanding and increasing protein stability. **Biochimica et Biophysica Acta**. p. 1-14, 1995.
- FARINAS, C.S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação**. 1 ed. 2011.
- FERNÁNDEZ, G. M.; ÚBEDA, J. F.; VASUDEVAN, T. G. OTERO, R. R.; BRIONES, A. I. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. **FEMS Microbiology Letters**, v.237, p. 261–266, 2004.
- GOMES, E., LEITE, R. S. R., SILVA., R., SILVA., D. Purification of an Exopolygalacturonase from *Penicillium viridicatum* RFC3 Produced in Submerged Fermentation. **International Journal of Microbiology**, vol. 2009, 8 pages, 2009.
- GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova.**, vol.30, p. 136-145, 2007.

- HAMELINCK, C. N. HOOIJDONK, G.V.; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005.
- HICKEY, D. A.; SINGER G. A. C. Genomic and proteomic adaptations to growth at high temperature. **Genome Biology**, v. 5, p. 1-7, 2004.
- IUBMB - Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) "Units of Enzyme Activity" . Eur. J. Biochem. 97 (2): 319–320, 1979.
- JAENICKE, R. Stability and folding of ultrastable proteins: Eye lens crystallines and enzymes from thermophiles. **The FASEB Journal**; 10: 84-92, 1996a.
- JAENICKE, R. How do proteins acquire their three-dimensional structure and stability? **Naturwissenschaften**; 83(12):544-54, 1996b.
- JAVED M. R., RASHID M. H., NADEEM H., RIAZ M., PERVEEN R. Catalytic and thermodynamic characterization of endoglucanase (CMCase) from *Aspergillus oryzae* cmc-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**;157:483–97, 2009.
- KAUR, G.: KUMAR S.: SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* *Apinis*. **Bioresource Technology**. p. 239-43, 2004.
- KHAN, M.; NAKKEERAN, E.; KUMAR-UMESH, S. Potential Application of Pectinase in Developing Functional Foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, p. 21-34, 2013.
- KOGA, Y. Thermal Adaptation of the Archaeal and Bacterial Lipid Membranes. **Hindawi Publishing Corporation**, p. 1-6, 2012.
- LANG C.; DÖRNENBURG H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**. p. 366-375, 2000.

- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10^a ed. São Paulo: Pearson Education, 2004. cap. 14. p. 463-467.
- MADIGAN, M. T.; OREN, A. Thermophilic and halophilic extremophiles. **Ecology and industrial microbiology**. v. 2, p. 265-269, 1999.
- MAHESHWARI R.; BHARADWAJ G.; BATH M.K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**., v. 64, p.461–488, 2000.
- MARTIN, N. **Purificação e caracterização da poligalacturonase termoestável produzida pela linhagem fúngica *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 em fermentação em estado sólido e submersa. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, UNESP**. Rio Claro, 2010.
- MAYER, M. P.; BRECHMER, D.; GÄSSLER, C. S.; BUKAU, B. Hsp70 chaperone machines. **Advances in Protein Chemistry**. p. 1-44,, 2001.
- MICHAELIS, L.; MENTEN, M. **Die Kinetik der Invertinwirkung, Biochemistry**. Z. 49, 333-369, 1913.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Plant Biology**, p. 266-277, 2008.
- MUKHOPADHYAY, A.; HAZRA, P. P.; SENGUPTA, T.; SAHA, R.; NANDI, R.; SENGUPTA, S. Protein-Protein Interaction Conferring Stability to an Extracellular Acetyl (Xylan) Esterase Produced by *Termitomyces clypeatus* (pages 720–726).**Biotechnology Progress**, p. 720-726, 2003.
- MURPHY, J. D. McCARTHY, K. Ethanol production from energy crops and waste for use as a transport fuel in Ireland. **Applied energy**, p. 148-166, 2005.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Medical research of Jewish Hospital**, p. 375-380, 1944.

- PACK, S. P.; YOO, Y. J. Packing-based difference of structural features between thermophilic and mesophilic proteins. **Int J Biol Macromol**, v. 35, p. 169-174, 2005.
- PEDROLI, D. B., MONTEIRO, A. C., GOMES, E., CARMONA, E. C. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, v. 3, p. 9-18, 2009.
- POLIZELI, M. L. T. M. ; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C. ; SILVA, T. M. ; MALLER, A. ; Cabral, H. . Gel electrophoresis for investigating enzymes with biotechnological application. **Gel Electrophoresis**. 1ed.Rijeka: InTech, v. 2, p. 97-110, 2012..
- RHODES, D.G.; LAUE, T.M. Determination of Purity. **Methods in Enzymology**. 182, p. 555-565, 1990.
- ROMBOUTS F. M.; PILNIK W. Pectic enzymes. **Microbial Enzymes and Bioconversions**. P. 227-272,1980.
- SANCHEZ L. **TCA protein precipitation**. Protocols on line. 2001 <
http://www.its.caltech.edu/~bjorker/Protocols/TCA_ppt_protocol.pdf> Acesso em 13 de junho de 2014.
- SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por Penicillium oxalicum utilizando resíduos agroindustriais**. Dissertação apresentada à Universidade federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular – 2005.
- SAQUIB, A. A. N.; HASSAN, M.; KHAN, N. F.; BAIG, S. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, vol. 45, p. 641-646, 2010.
- SAQUIB, A.A.N.; FAROOQ, A.; IQBAL, M.; HASSAN, J. UL.; HAYAT, U.; BAIG, S. A thermo-stable crude endoglucanase produced by *Aspergillus fumigatus* in a novel solid state fermentation process using isolated free water. **Enzyme Research**, p. 1-6, 2012.
- SCHLEY P. D.; FIELD C. J. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. **British Journal of Nutrition**., p. 221–230, 2002.

- SCOPES, R. **Protein Purification: Principles and Practice**, Springer-Verlag, New York. 1993.
- SEE, Y.P.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weight of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: **Protein Structure: A practical approach**, p. 1-22. Editor: T.E. Creighton, IRL Press, Oxford, Inglaterra, 1990.
- SEIFZADEH, S.; SAJEDI, R. H. SARIRI, R. Isolation and characterization of thermophilic alkaline proteases resistant to sodium dodecyl sulfate and ethylene diamine tetraacetic acid from *Bacillus* sp. GUS1. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 214-221, 2008.
- SHARMA D. C.; SATYANARAYANA T. A marked enhancement in the prduction of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. **Bioresource Technology**., p. 727-733, 2006.
- SHIMA, S.; THAUER, R. K.; ERMLER, U. Hyperthermophilic and salt-dependent formyltransferase from *Methanopyrus kandleri*. **Thermophiles**, p. 269-272, 2004.
- SHIRAKI, K.; NISHIKORI, S.; FUJIWARA, S.; HASHIMOTO, H.; KAI, Y.; TAKAGI, M.; IMANAKA, T. Comparative analyses of the conformational stability of a hyperthermophilic protein and its mesophilic counterpart. **European Journal of Biochemistry**., p. 4144-4150, 2001.
- SIDDIQUI, K. S.; SAQIB, A. A. N; RASHID M. H.; RAJOKA, M. I. Thermostabilization of carboxymethyl-cellulase from *Aspergillus niger* by carboxyl group modification. **Biotechnology Letters**, p. 325-329, 1997.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- THIBAUT, J. F. Les substances pectiques, in: **Les polymeres vegetaux**, Monties B. Gauthier-Vilars, 1980.

- TOMAZIC, S. J.; KLIBANOV, A. M. Why is one *Bacillus* alpha-amylase more resistant against irreversible thermoinactivation than another? **The Journal of Biological Chemistry**, v. 5, p. 3091-3096, 1988.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. M.; Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 30, p. 388-394, 2007.
- VIEILLE, C.; ZEIKUS, J.G. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 1-43, 2001.
- VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G.-J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, p. 263-275, 2009.
- WANG, C.; EUFEMI, M.; TURANO, C.; GIARTOSIO, A. Influence of the Carbohydrate Moiety on the Stability of Glycoproteins. **Biochemistry**, vol. 35, p. 7299-7307, 1996.
- ZHU, J.; LIU, H.; ZHANG, J.; WANG, P.; LIU, S.; LIU, G.; WU, L. Effects of Asn-33 glycosylation on the thermostability of *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1-9, 2014.