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

**PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASES POR FUNGOS TERMOFÍLICOS E
MESOFÍLICOS EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E COMPARAÇÃO
DAS ISOFORMAS DA ENZIMA PRODUZIDAS POR CADA GRUPO.**

ALEXANDRE COSTA MONTEIRO

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

Abril - 2008

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

**PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASES POR FUNGOS TERMOFÍLICOS E
MESOFÍLICOS EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E COMPARAÇÃO
DAS ISOFORMAS DA ENZIMA PRODUZIDAS POR CADA GRUPO.**

ALEXANDRE COSTA MONTEIRO

Orientadora: Prof^a Dr^a Eleni Gomes

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

Abril - 2008

Dedico:

Às pessoas que me são mais queridas:

Meus pais, Luiz Carlos e Nunce,

Meus irmãos Marcos e Paula.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e oportunidades que me concedeu.

À profa. Dra. Eleni Gomes, pela orientação e aprendizado que me proporcionou e pela imensa paciência.

Ao prof. Dr. Roberto da Silva.

Aos meus pais, pelo inefável apoio, pelas orações e pelo muito que sacrificaram pelos meus estudos.

Aos meus irmãos pela amizade e incentivo.

Aos amigos Eduardo, que muito me ajudou nos primeiros passos, e Rodrigo, pelo companheirismo e pelos muitos esclarecimentos e ajuda em todos os momentos em que precisei.

À Paula, pela amizade verdadeira e pelo muito que me ajudou, especialmente nos momentos finais.

A todos os amigos e colegas do laboratório pela agradável convivência e colaboração, especialmente à Natália e à Aline.

À Heloiza, que com sua admirável dedicação ao laboratório e com sua generosa colaboração contribuiu, direta e indiretamente, para que este trabalho fosse executado.

Ao César e ao Alex pela generosa hospitalidade.

Aos irmãos da Peniel.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa.

À FAPESP, pelo importante suporte financeiro.

“O que guarda a sua boca e a sua língua guarda a
sua alma das angústias.”
Provérbios 21:23

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Pectinas	3
2.2 Protopectinases	6
2.3 Esterases	6
2.4 Poligalacturonases	7
2.5 Liasas	8
2.5.1 Pectato-liase	8
2.5.2 Pectina-liase	9
2.6 Produção de pectinases em fermentação em estado sólido	10
2.7 Múltiplas formas de pectinases	13
2.8 Aplicações de pectinases	18
3. OBJETIVOS	24
3.1 Geral	24
3.2 Específicos	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Microrganismos	26
4.2 Meios de manutenção	26
4.3 Fermentação em Estado Sólido	26
4.4 Medida da atividade de poligalacturonase	27
4.5 Determinação de proteínas totais	28
4.6 Fracionamento e isolamento das frações de PGs	28
4.7 Zimograma	29
4.8 Determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade das enzimas	30
4.9 Determinação da estabilidade das enzimas frente a variações de temperatura e pH	30
4.10 Avaliação da especificidade pelo substrato	31

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Produção de PGs em FES em farelo de trigo	32
5.2 Caracterização físico-química das PGs nas soluções enzimáticas brutas	35
5.2.1 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade das PGs.....	35
5.2.2 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade das PGs	41
5.3 Determinação das atividades de Endo-PGs nas soluções enzimáticas brutas	47
5.4 Fracionamento das PGs por filtração em gel e zimogramas	48
5.5 Caracterização físico-química das PGs dos fungos termofílicos obtidas por filtração em gel.....	55
5.5.1 Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade das PGs e termoestabilidade das PGs	55
5.6 Determinação da especificidade pelo substrato das PGs dos fungos termofílicos	60
5.7 Produção de PG em FES por <i>A. fumigatus</i> em diferentes substratos	62
6. CONCLUSÕES	64
7. LITERATURA CITADA	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Molécula de Homogalacturona, Molécula de Ramnogalacturona, Neutralização das cargas negativas de moléculas de homogalacturona por íons Ca^{2+}	4
Figura 02: Representação das atividades de pectinases sobre uma molécula de galacturona com regiões metiladas e não metiladas.....	10
Figura 03: Produção de PG pelos fungos mesofílicos <i>A. niger</i> e <i>P. italicum</i>	33
Figura 04: Produção de PG pelos fungos termofílicos <i>R. pusillus</i> e <i>T. lanuginosus</i> e termofílico <i>A. fumigatus</i>	33
Figura 05: Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade de PG de solução enzimática bruta obtida no 11º dia de cultivo de <i>A. niger</i> em farelo de trigo.....	36
Figura 06: Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade de PG de solução enzimática bruta obtida no 4º dia de cultivo de <i>P. italicum</i> em farelo de trigo.....	37
Figura 07: Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade de PG de solução enzimática bruta obtida no 12º dia de cultivo de <i>A. fumigatus</i> em farelo de trigo.....	38
Figura 08: Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade de PG de solução enzimática bruta obtida no 6º dia de cultivo de <i>R. pusillus</i> em farelo de trigo	39
Figura 06: Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade de PG de solução enzimática bruta obtida no 2º dia de cultivo de <i>T. lanuginosus</i> em farelo de trigo.....	40
Figura 10: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG em solução enzimática bruta obtida no 11º dia de cultivo de <i>A. niger</i> em farelo de trigo.....	41
Figura 11: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG em solução enzimática bruta obtida no 4º dia de cultivo de <i>P. italicum</i> em farelo de trigo.....	42
Figura 12: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG em solução enzimática bruta obtida no 12º dia de cultivo de <i>A. fumigatus</i> em farelo de trigo.....	43
Figura 13: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG em solução enzimática bruta obtida no 6º dia de cultivo de <i>R. pusillus</i> em farelo de trigo.....	44
Figura 14: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG em solução enzimática bruta obtida no 2º dia de cultivo de <i>T. lanuginosus</i> em farelo de trigo.....	45
Figura 15: Atividades de Exo-PG e Endo-PG obtidas pelo cultivo dos mesofílicos e termofílicos em farelo de trigo.....	47
Figura 16: (A) Perfil de eluição de PGs produzidas por <i>A. niger</i> em coluna de filtração em gel Sephadex G-100. (B) Zimograma em PAGE.....	49

Figura 17: (A) Perfil de eluição de PGs produzidas por <i>P. italicum</i> em coluna de filtração em gel Sephadex G-100. (B) Zimograma em PAGE.....	50
Figura 18: (A) Perfil de eluição de PGs produzidas por <i>A. fumigatus</i> em coluna de filtração em gel Sephadex G-100. (B) Zimograma em PAGE.....	51
Figura 19: (A) Perfil de eluição de PGs produzidas por <i>R. pusillus</i> em coluna de filtração em gel Sephadex G-100. (B) Zimograma em PAGE.....	53
Figura 20: (A) Perfil de eluição de PGs produzidas por <i>T. lanuginosus</i> em coluna de filtração em gel Sephadex G-100. (B) Zimograma em PAGE.....	54
Figura 21: Efeito do pH sobre a atividade de PG do fungo <i>A. fumigatus</i> obtida por filtração em gel Sephadex G-100.....	55
Figura 22: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG do fungo <i>A. fumigatus</i> obtida por filtração em gel Sephadex G-100.....	56
Figura 23: Efeito do pH sobre a atividade de PG do fungo <i>R. pusillus</i> obtida por filtração em gel Sephadex G-100	57
Figura 24: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG do fungo <i>R. pusillus</i> obtida por filtração em gel Sephadex G-100	58
Figura 25: Efeito do pH sobre a atividade de PG do fungo <i>T. lanuginosus</i> obtida por filtração em gel Sephadex G-100	59
Figura 26: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG do fungo <i>T. lanuginosus</i> obtida por filtração em gel Sephadex G-100.....	60
Figura 27: Especificidade ao substrato das PGs brutas e eluídas	61
Figura 28: Produção de PG pelo fungo <i>A. fumigatus</i> em diferentes substratos.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Propriedades das enzimas brutas caracterizadas	46
Tabela 02: Razão entre os valores de atividade de Endo-PG e Exo-PG	48
Tabela 03: Fracionamento de PGs produzidas por <i>A. niger</i> em coluna Sephadex G-100 a partir da solução enzimática bruta obtida em 11 dias de fermentação.	49
Tabela 04: Fracionamento de PGs produzidas por <i>P. italicum</i> em coluna Sephadex G-100 a partir de solução enzimática bruta obtida em 4 dias de fermentação...	50
Tabela 05: Fracionamento de PGs produzidas por <i>A. fumigatus</i> em coluna Sephadex G-100 a partir da solução enzimática bruta obtida em 12 dias de fermentação.	52
Tabela 06: Fracionamento de PGs produzidas por <i>R. pusillus</i> em coluna Sephadex G-100 a partir da solução enzimática bruta obtida em 6 dias de fermentação...	53
Tabela 07: Fracionamento de PGs produzidas por <i>T. lanuginosus</i> em coluna Sephadex G-100 a partir da solução enzimática bruta obtida em 2 dias de fermentação...	54

LISTA DE ABREVIATURAS

Endo-PG(s)	Endo-Poligalacturonase(s)
Exo-PG(s)	Exo-Poligalacturonase(s)
FES	Fermentação em estado sólido
FSm	Fermentação submersa
GA	Ácido galacturônico
IL	Interleucina
OGA(s)	Oligogalacturonídeo(s)
PeL	Pectato-liase
PG(s)	Poligalacturonase(s)
PGIP(s)	Proteína(s) inibidora(s) de poligalacturonase(s)
PME	Pectina-esterase
PnL	Pectina-liase

RESUMO

As pectinases são enzimas com importantes aplicações econômicas, especialmente na indústria alimentícia. Pectinases termoestáveis, produzidas por microrganismos termofílicos, apresentam uma série de características que favorecem sua aplicação em processos industriais, como, por exemplo, estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura e maior tolerância a agentes químicos desnaturantes de proteínas. Contudo, os principais microrganismos empregados na produção de poligalacturonases (PGs) são fungos mesofílicos. O presente trabalho teve por objetivo realizar um estudo comparativo de produção de PGs em fermentação em estado sólido (FES) por fungos mesofílicos e termofílicos. Foram utilizados os fungos mesofílicos *Aspergillus niger* NRRL 3112 e *Penicillium italicum* IZ 1584, reconhecidos como bons produtores de PGs, os termofílicos *Thermomyces lanuginosus* ROB e *Rhizomucor pusillus* A13.36 e o termodúrico *Aspergillus fumigatus* N31. Os microrganismos foram cultivados em FES em farelo de trigo, os mesofílicos a 27°C e os demais a 45°C, por períodos de 10 a 15 dias. Os maiores produtores de PG foram *P. italicum* IZ 1584 (51U/g) e *A. fumigatus* N31 (59,40 U/g). As PGs dos fungos termofílicos apresentaram maiores valores de temperatura ótima e maior termoestabilidade que as dos mesofílicos. *T. lanuginosus* produziu PG com maior valor de temperatura ótima (70°C). *A. fumigatus* produziu a PG mais termoestável, que conservou 100% da atividade original após 1 h de incubação a 50°C em ausência de substrato. Cromatografias em filtração em gel e zimogramas revelaram a expressão de 7 isoformas de PG em *A. niger* NRRL 3112, 3 isoformas em *P. italicum* IZ 1584, *T. lanuginosus* ROB e *R. pusillus*, e 2 isoformas em *A. fumigatus* N31.

Palavras chave: poligalacturonase, termofílicos, mesofílicos, isoformas.

ABSTRACT

Pectinases are enzymes with important economic applications, especially in food industry. Thermostable pectinases, produced by thermophilic microorganisms, display an array of characteristics that support their application in industrial processes, such as stability through a wide pH and temperature range, as well as higher tolerance to protein denaturing chemical agents. However, the major microorganisms employed in polygalacturonases (PGs) production are mesophilic fungi. The present work aimed to make a comparative study of PG production by mesophilic and thermophilic fungi in Solid-State Fermentation (SSF). The fungi employed were the mesophilic *Aspergillus niger* NRRL 3112 and *Penicillium italicum* IZ 1584, both known as good PGs producers, the thermophilic *Thermomyces lanuginosus* ROB and *Rhizomucor pusillus* A13.36 and the thermotolerant *Aspergillus fumigatus* N31. The fungi were bred in wheat bran in SSF, the mesophilic at 27°C and the others at 45°C, during periods of 10 to 15 days. The higher PGs producers were *P. italicum* IZ 1584 (51U/g) and *A. fumigatus* N31 (59,40 U/g). PGs of thermophilic fungi have shown higher values of optimum temperature and thermostability than mesophilic PGs.

T. lanuginosus produced PG with the higher value of optimum temperature for activity (70°C). *A. fumigatus* have shown the most thermostable PG, which maintained 100% of its original activity after 1 h of incubation at 50°C in absence of substrate. Gel filtration chromatography and zymograms revealed the expression of 7 PG isoforms for *A. niger*, 3 isoforms for *P. italicum* IZ 1584, *T. lanuginosus* ROB and *R. Pusillus*, and 2 isoforms for *A. fumigatus* N31.

Key words: polygalacturonase, thermophilic, mesophilic, isoforms.

1. INTRODUÇÃO

Substâncias pécticas são polissacarídeos estruturais encontrados principalmente na lamela média e parede celular primária das células dos vegetais superiores (DOESBURG, 1965; KAWABATA, 1977), Ainda que correspondendo a uma faixa de apenas 0,5 a 4 % da massa fresca dos vegetais, segundo KASHYAP e colaboradores (2001), elas são grandes responsáveis pela integridade e aderência de seus tecidos (ROMBOUTS e PILNIK, 1980).

As pectinases constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécticas presentes no material vegetal e são produzidas por plantas superiores, fungos filamentosos, leveduras e bactérias (ROMBOUTS e PILNIK, 1980). A classificação destas enzimas é baseada no modo de ataque à cadeia de ácido poligalacturônico dos polímeros pécticos, sendo descritos três tipos de enzimas: as desesterificantes (pectina-esterases), as despolimerizantes (hidrolases e liases) e as protopectinases. A classificação ainda pode ser baseada na preferência pelo substrato (pectina ou pectato) e na região em que atuam na molécula, podendo, neste caso, atuar de forma randômica (atividade endo) ou a partir da extremidade não redutora da molécula (atividade exo) (FOGARTY e WARD, 1972; ROMBOUTS e PILNIK, 1980; KASHYAP *et al.*, 2001). A produção de múltiplas formas de pectinases por vários microrganismos foi relatada em vários trabalhos. O sentido da expressão de diversas enzimas pectinolíticas por uma única espécie

parece estar relacionado a mecanismos de fitopatogenia (NAESSENS e VANDAMME, 2003).

Há um significativo interesse no uso de técnicas de fermentação em estado sólido (FES) para produzir uma ampla variedade de enzimas, especialmente por fungos. Isso ocorre porque o uso da FES acarreta diversas vantagens sobre a fermentação submersa (FSm), destacando-se a da obtenção de maiores volumes de enzimas (GONZÁLEZ-VINIEGRA *et al.*, 2001). É crescente o interesse na utilização de resíduos vegetais como fonte de energia e carbono para a produção de enzimas microbianas, dentre elas as pectinases, em FES (KAUR *et al.*, 2004).

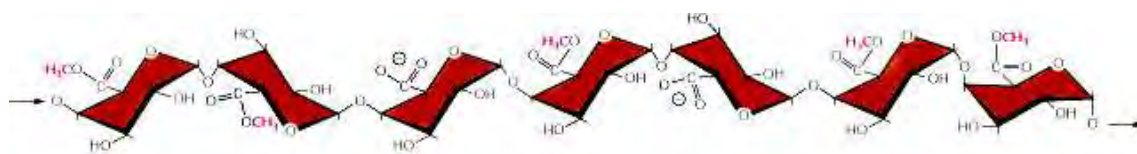
Apesar da predominância do emprego de microrganismos mesofílicos em estudos de FES, o interesse na aplicação de espécies termofílicas em processos fermentativos é crescente (FREITAS *et al.* 2006). Enzimas de termofílicos são, de modo geral, mais estáveis a temperatura, ao pH e a agentes químicos do que enzimas de mesofílicos (BRUINS *et al.* 2001; HAKI e RAKSHIT, 2003).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

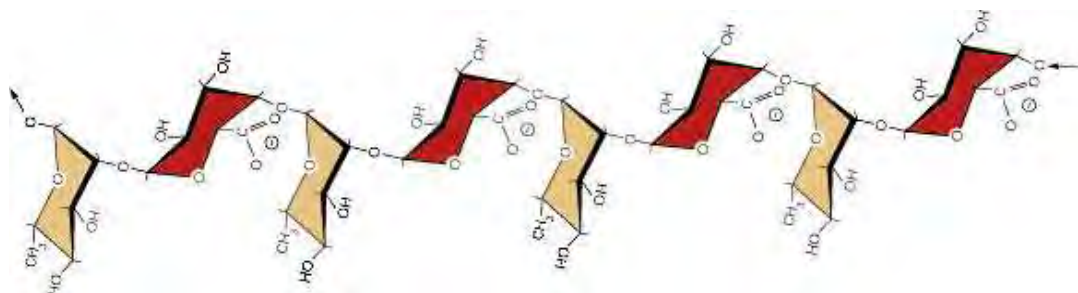
2.1 Pectinas

As pectinas são uma família de polissacarídeos complexos que promovem a aderência das paredes celulares entre células vegetais adjacentes formando uma estrutura rígida pela interação com a celulose, a hemicelulose e a lignina (FRY, 1986; MC NEILL *et al*, 1984; FOGARTY e WARD, 1972). Polissacarídeos pécticos são formados por duas regiões interligadas: a homogalacturonana e a ramnogalacturonana (Figura 01). A primeira é um homopolímero formado por uma cadeia linear de resíduos de ácido D-galactopiranosilurônico unidos por ligações α -1,4-D-glicosídicas. Esses resíduos de ácido D-galacturônico podem ter alguns de seus grupos carboxila metil-esterificados ou O-acetilados nos carbonos 3 ou 2 (Figura 01). A ramnogalacturonana é um heteropolímero que tem a estrutura principal formada por repetidas unidades de ácido galactopiranosilurônico ligado à ramnose por ligações β -(1→2) e β -(1→4) e cadeias laterais consistindo de arabinose e galactose (RIDLEY *et al*, 2001; PÉREZ *et al*, 2000).

(A)



(B)



(C)

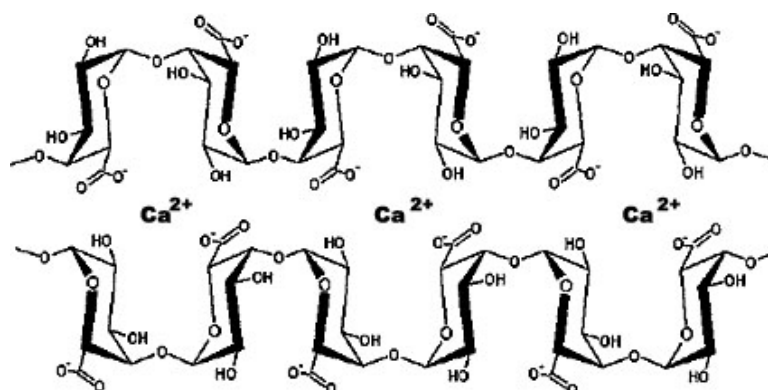


Figura 01: A) Molécula de Homogalacturona. B) Molécula de Ramnogalacturona. C) Neutralização das cargas negativas de moléculas de homogalacturona por íons Ca^{2+} . (figuras originais: <http://www.uky.edu/~dhild/biochem/11B/lect11B.html>)

“Substâncias pécicas” é uma expressão genericamente empregada para os compostos que sofrem a ação das enzimas pectinolíticas. Elas são macromoléculas glicosídicas complexas de alta massa molecular. São polissacarídeos acídicos, negativamente carregados devido à ionização de grupos metoxil. Estas cargas são neutralizadas por íons, principalmente Ca^{2+} (JAYANI *et al*, 2005) (Figura 01C). A Sociedade Americana de Química (American Chemical Society) classificou as substâncias pécicas em quatro tipos principais (ALKORTA *et al*, 1998; JAYANI *et al*, 2005):

- (1) Protopectina: É a substância pécica insolúvel em água presente no tecido intacto. A hidrólise restrita da protopectina produz pectina ou ácidos pécicos.
- (2) Ácido pécico: É o polímero solúvel das galacturonanas que contem uma quantia negligível de grupos metoxil. Sais ácidos ou normais de ácidos pécicos são chamados pectatos.
- (3) Ácidos pectínicos: É a cadeia de poligalacturonana que contem unidades de galacturonato metilado >0 e $<75\%$. Sais ácidos ou normais de ácido pectínico são considerados pectinatos.
- (4) Pectina (galacturonato polimetil): É o material polimérico no qual, pelo menos, 75% de grupos carboxil das unidades de galacturonato estão esterificados com metanol. Isto confere rigidez na parede celular quando está ligado à celulose.

A degradação desses polissacarídeos requer um sistema enzimático complexo. Os fungos *Aspergillus* sp (FREITAS *et al*, 2006; DEBING *et al*, 2006; PANDA *et al*, 2004; DE VRIES & VISSER, 2001), *Penicillium* sp (SILVA *et al*, 2002; VIDAL *et al*, 1999), *Saccharomyces cerevisiae* (BLANCO *et al*, 1997), *Thermomyces lanuginosus* (SINGH *et al*, 2003) e *Thermoascus aurantiacus* (PALMA-FERNANDES *et al*, 2002; MARTINS *et al*, 2002) são alguns exemplos de microrganismos produtores de enzimas pectinolíticas.

Existem três tipos de pectinases: Protopectinases, Esterases e Despolimerizantes.

2.2 Protopectinases

São enzimas que solubilizam protopectinas. Liberam pectinas solúveis e altamente polimerizadas a partir da protopectina (ALKORTA *et al*, 1998; KASHYAP *et al*, 2001).

São classificadas em dois tipos: Um reage com a região do ácido poligalacturônico da protopectina (tipo A) e outro com cadeias de polissacarídeo que podem conectar o ácido poligalacturônico com os constituintes da parede celular (tipo B) (SAKAI *et al*, 1993).

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

2.3 Esterases

Pectina-esterases (EC 3.1.1.11) são conhecidas também como pectina-metil-esterases, pectase, pectina metoxilase ou pectina-metil-hidrolases (KYRIAKIDIS, 1999).

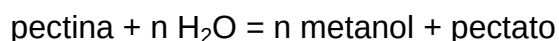
Pectina-esterases catalisam a desesterificação do grupo metoxila da pectina formando ácido péctico (KASHYAP *et al*, 2001). Este processo libera metanol e grupos carboxílicos livres na cadeia de pectina (KORNER, ZIMMERMANN e BERK, 1980; VERSTEEG, 1979; WICKER, VASSALO E ECHERVERRIA, 1988).

As pectina-esterases são as primeiras enzimas a atuar na degradação da pectina (SAKAI *et al*, 1993), permitindo que poligalacturonases

(HUBER, 1983) e liases atuam no produto (SAKAI *et al*, 1993). Biologicamente, são de grande importância, pois permitem a ação posterior de pectinases que só atuam sobre compostos pécticos com menor grau de esterificação. São produzidas por fungos filamentosos, leveduras, bactérias e vegetais superiores (SAKAI *et al*, 1993), no quais ocorrem em diversos tecidos, especialmente nos frutos (BARON E THIBAUT, 1985).

A atividade enzimática pode ser determinada pelo método de Kertez (1937) em que se faz a titulação dos grupos carboxílicos liberados dos ácidos galacturônicos da pectina, ou pelo método de difusão em gel, em que a ação da enzima é detectada pela formação de uma zona manchada em gel de agarose com pectina de alta esterificação (DOWNIE *et al*, 1998).

A reação genérica pode ser apresentada da seguinte forma:



2.4 Poligalacturonases

As poligalacturonases (PGs) são enzimas despolimerizantes que catalisam a hidrólise da cadeia de ácido poligalacturônico (JAYANI *et al*, 2005).

As PGs podem ser classificadas como Endo-poligalacturonases (Endo-PGs) ou Exo-poligalacturonases (Exo-PGs), de acordo com o seu modo de ataque ao substrato.

Endo-PGs (E.C. 3.2.1.15) hidrolisam, de forma randômica, as ligações glicosídicas internas entre os resíduos de ácidos galacturônicos, causando a despolimerização da molécula, liberando oligogalacturonatos como produtos.

Exo-PGs são subdivididas em Exo-PG-1 (E.C. 3.2.1.67), que hidrolisa as ligações sucessivas do ácido poligalacturônico a partir da

extremidade não redutora, liberando ácidos galacturônicos livres e Exo-PG-2 (E.C. 3.2.1.82), que hidrolisa as ligações alternadas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos digalacturônicos livres (JAYANI *et al*, 2005;. DA SILVA *et al*, 1997; PILNIK E ROMBOUTS, 1981).

A atividade da PG é determinada medindo-se, durante o curso da reação, a taxa de aumento no número de grupos redutores e/ou a diminuição da viscosidade da solução com substrato em um aparelho denominado viscosímetro. No primeiro caso, a quantidade de açúcares redutores pode ser medida pelo método colorimétrico usando o reagente 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959) ou pelo método de Somogyi-Nelson (1944).

2.5 Liases

São enzimas despolimerizantes que clivam as ligações α -1-4 de pectatos ou pectinatos por transeliminação de hidrogênio, o que resulta em galacturonídeos com ligação insaturada entre C4 e C5, na terminação não redutora do ácido galacturônico formado (SAKAI *et al*, 1993 ; KASHYAP *et al*, 2001).

2.5.1 Pectato-liase

Pectato-liase (EC 4.2.2.2) é a enzima mais bem estudada entre as pectinases. Pectato-liases atacam, randomicamente, pectatos e pectinas com baixo grau de esterificação. São dependentes de Ca^{2+} para atividade e possuem pH ótimo na categoria neutro-alcalino, entre 8-10, o que limita o seu uso na indústria alimentícia. São produzidas por várias espécies de bactérias, incluindo *Bacillus* sp, *Erwinia* sp. (SEMENOVA *et al*, 2006; WHITACKER, 1989; SINGH *et al*, 1999) e *Amycolata* sp (BRUHLMANN *et al*, 1994).

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

Endo-poligalacturonato liase: ataca o ácido pécico aleatoriamente, liberando oligogalacturonatos insaturados (JAYANI *et al*, 2005).

Exo-poligalacturonato liase: ataca o ácido pécico a partir da terminação redutora, liberando 4-5 digalacturonatos (JAYANI *et al*, 2005) e 4-5 trigalacturonatos insaturados (SATO e KAJI, 1977).

2.5.2 Pectina-liase

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

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

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

Endo-Polimetilgalacturonato liases: atacam polimetilgalacturonatos randomicamente, liberando metiloligogalacturonatos insaturados.

Exo-Polimetilgalacturonato liases: atacam polimetilgalacturonatos a partir da terminação redutora liberando metilmonogalacturonatos insaturados.

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

A Figura 02 representa os modos de ação dos diferentes tipos de pectinases (TEN HAVE, 2000).

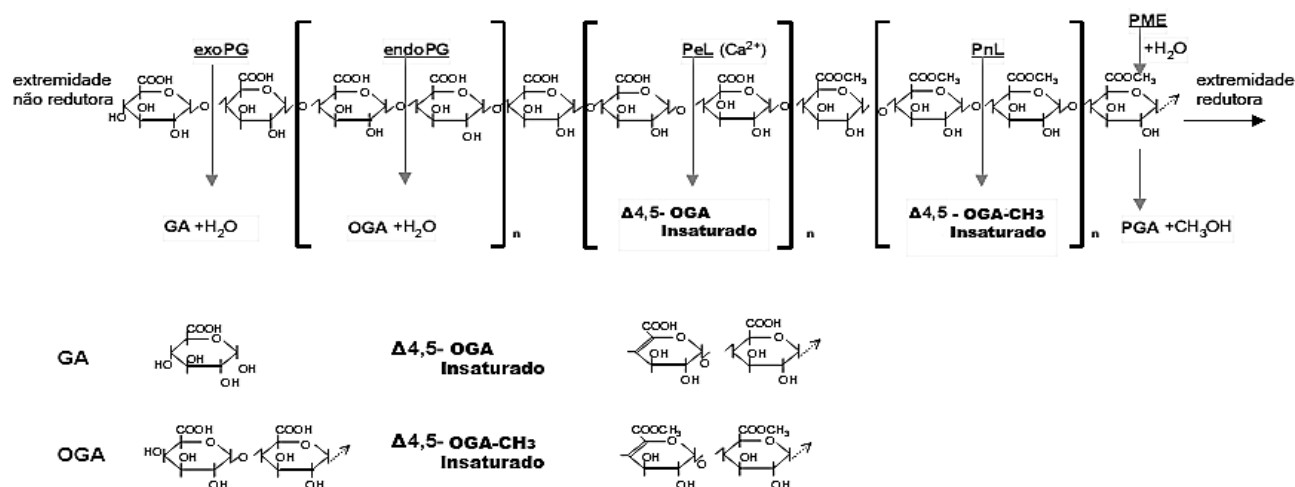


Figura 02: Representação das atividades de pectinases sobre uma molécula de galacturona com regiões metiladas e não metiladas. Poligalacturonases (exoPG e endoPG) hidrolisam o ácido poligalacturônico (PGA) na ligação glicosídica α ,1-4 resultando em ácido monogalacturônico (GA) e ácido oligogalacturônico (OGA), respectivamente. Pectato-liase e Pectina-liase (PeL e PnL) executam a β -eliminação. PnL atua sobre a galacturona metilada, resultando em OGA com uma ligação insaturada Δ 4,5 na extremidade não redutora. A Pectinametilesterase (PME) promove a desmetoxilação da pectina resultando em PGA (TEN HAVE, 2000).

2.6 Produção de pectinases em fermentação em estado sólido

Fermentação em estado sólido (FES) é definida como a fermentação envolvendo sólidos em ausência ou quase ausência de água entre as partículas de substrato. Contudo, o substrato deve reter umidade suficiente para sustentar o crescimento e o metabolismo do microrganismo (PANDEY 2000).

A literatura relata uma série de vantagens decorrentes da aplicação deste processo, tais como: baixo custo, alta produtividade e concentração dos produtos, menor requerimento de espaço e energia, dentre outras (LONSANE *et al.*, 1992; TREJO-HERNÁNDEZ *et al.*, 1991; HESSELTINE, 1972).

A alta produtividade é um aspecto especialmente interessante em processos de fermentação sólida. É freqüentemente citado que em FES as taxas de produção de enzimas são maiores que em fermentação submersa (FSm) para uma mesma linhagem e substrato. Por essa razão, há um interesse significativo em utilizar técnicas de FES para produzir uma ampla variedade de enzimas (PANDEY, 1999). Para González-Viniegra e colaboradores (2002), as razões dessa maior produtividade em FES relacionam-se ao fato de que em FES ocorre maior produção de biomassa, menor atividade de proteases, menor suscetibilidade à repressão catabólica e mais eficiente transferência de oxigênio do que em FSm. Acredita-se que FES é uma condição mais próxima ao habitat, logo os microrganismos estão aptos a produzir enzimas nestas condições (PANDEY, 2002).

Além disso, FES oferece numerosas oportunidades no processamento de resíduos agro-industriais. Isso porque, de certo modo, FES têm menor requerimento energético, produzem menos resíduos líquidos e são ecologicamente amigáveis, uma vez que resolvem, em parte, o problema de descarte dos resíduos sólidos disponíveis (PANDEY, 2000). Este processo é, portanto, de especial interesse em países que possuem abundância de biomassa e de resíduos agro-industriais (PANDEY *et al.*, 2000; HESSELTINE, 1972), como o Brasil.

O processo fermentativo em estado sólido tem sido aplicado com sucesso, quer para produção de pectinases bacterianas (SOARES *et al.*, 1999) quer para pectinases fúngicas (ACUÑA-ARGÜLLES *et al.*, 1994). Microrganismos pectinolíticos podem ser cultivados em vários tipos de meio de cultura de baixo custo para a obtenção do metabólito desejado. A capacidade

destes microrganismos de crescerem em materiais ligno-hemi-celulósicos pode ser utilizada como uma forma de aproveitamento de resíduos vegetais.

A produção de vários tipos de pectinases já foi descrita em pectinas purificadas de citrus, maçã e beterraba de açúcar, em ácido poligalacturônico e em ramnose e ácido galacturônico. A literatura relata também a produção de pectinases em diversos substratos vegetais como polpa de maçã, farinha de soja, polpa da beterraba de açúcar, casca de arroz, palha de milho, sabugo de milho, cascas e sementes de frutas, farelo de trigo, bagaço ou casca de laranja, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de café e polpa de cacau (CASTILHO *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 1999; FREITAS *et al.*, 2006; PANDA *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002; DA SILVA *et al.*, 1997; BOCCAS *et al.*, 1994; SCHWAN *et al.*, 1997; HANG e WOODAMS, 1994, SIDI *et al.*, 1984; FONSECA e SAID, 1994; MARTIN *et al.*, 2004; ACUÑA-ARGÜELLES *et al.*, 1994).

Na grande maioria dos estudos com FES, são utilizados microrganismos mesofílicos, os quais não toleram temperaturas acima de 40°C, o que dificulta o processo, pois as principais dificuldades na execução de FES são justamente os efeitos da transferência de calor e de massa. Durante a FES uma grande quantidade de calor, que é diretamente proporcional às atividades metabólicas do microrganismo, é gerada. Os materiais sólidos usados em FES possuem baixa condutividade térmica, por esta razão a remoção do calor do processo pode ser muito lenta e algumas vezes o acúmulo de calor é elevado a ponto de desnaturar os produtos formados e acumulados (PANDEY, 2002). O uso de microrganismos termofílicos tem demonstrado boa adaptação dos mesmos a esse processo (MARTINS *et al.*, 2002; FREITAS *et al.*, 2006).

Microrganismos termofílicos são definidos como aqueles que apresentam temperatura ótima de crescimento entre 40°C e 80°C (VIEILLE e ZEIKUS, 2001). Dentre as propriedades que as enzimas produzidas por esses organismos termofílicos apresentam, sob o ponto de vista de aplicação industrial, as mais importantes são a resistência a altas temperaturas, a enzimas proteolíticas e a agentes detergentes (BRUINS *et al.*, 2001; LEA *et al.*,

1998). O desenvolvimento de FES em temperaturas acima de 40°C traz outras vantagens, como a redução do risco de contaminação por mesofílicos.

A grande maioria das pesquisas de produção de pectinases tem focado a produção destas enzimas por linhagens fúngicas mesofílicas, principalmente pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, dos quais são obtidos os principais preparados comerciais de pectinases (SEMENOVA *et al.*, 2006; PANDEY *et al.*, 2000; SAID *et al.*, 1991). Por outro lado, são poucos os relatos na literatura sobre a produção de pectinases por linhagens termofílicas (MAHESHWARI *et al.*, 2000; MARTINS *et al.*, 2002; SATHISH-KUMAR e PALANIVELU, 1999; PUCHART *et al.*, 1999; SATHISH-KUMAR e PALANIVELU, 1998).

2.7 Múltiplas formas de pectinases

Estudos de produção de poligalacturonases microbianas têm revelado múltiplas formas destas enzimas, as quais diferem em massa molar, propriedades cinéticas e outras como glicosilação (DEVI e RAO, 1996; MINJARES-CARRANCO *et al.*, 1997). A IUPAC recomendou que o termo “múltiplas formas de enzimas” fosse considerado um termo genérico que compreende todas as proteínas catalisadoras de uma mesma reação em uma mesma espécie. O termo “isoenzimas” ou “isozimas” deve ser aplicado somente para aquelas múltiplas formas de enzimas que são originadas a partir de diferenciações, geneticamente determinadas, na estrutura primária e não para aquelas derivadas de modificações de uma mesma seqüência primária de aminoácidos (MOSS, 1992). Enzimas que catalisam uma mesma reação e possuem uma mesma estrutura primária, ao diferirem por alguma propriedade mensurável são chamadas pseudo-isozimas (PURICH e ALLISON, 2000).

Múltiplas formas de uma enzima ocorrem em uma ampla variedade de microrganismos. A síntese destas formas é freqüentemente dependente de características do cultivo como composição do meio,

parâmetros físico-químicos, tempo de cultivo e presença de agentes indutores ou inibidores. Múltiplas formas de enzimas aumentam a capacidade do organismo produtor de se adaptar e lidar com uma ampla variação de mudanças ambientais. As vantagens fisiológicas compensam o aparente desperdício da hiper-produção de múltiplas formas de uma enzima (NAESSENS e VANDAMME, 2003).

O significado da existência dessas múltiplas formas ainda não é claro, porém, algumas teorias são levantadas com relação a organismos patogênicos de plantas, para os quais, a produção de pectinases extracelulares é fator fundamental para o sucesso da infecção das plantas hospedeiras (RHA *et al*, 2001; OESER. *et al.*, 2002; ISSHIKI *et al.*, 2000).

A parede celular vegetal é a primeira linha de defesa das plantas. Ela atua como uma barreira fisiológica desempenhando um papel crítico no controle de invasões patogênicas. Os principais constituintes da parede celular vegetal são membros de duas redes de polissacarídeos, uma consistindo de celulose e hemicelulose, outra de compostos pécticos. Entretanto essa composição pode variar de acordo com a idade e as condições fisiológicas da planta, fazendo com que o patógeno precise de um amplo *pool* enzimático para o sucesso na infecção do tecido vegetal (DE LORENZO *et al*, 2001; JUGE, 2006).

A maioria dos microrganismos fitopatogênicos secreta uma série de enzimas de degradação de parede capazes de despolimerizar polissacarídeos da parede celular do hospedeiro. PGs são as primeiras enzimas a serem secretadas pelos patógenos quando eles encontram a parede celular vegetal, e sua contribuição à patogenicidade de alguns fungos e bactérias tem sido demonstrada pelo uso de ferramentas genéticas. Por exemplo, Kars e colaboradores (1999), demonstraram que a deleção do gene Bcpg2, codificante de uma isoforma de PG, em *Botrytis cinerea* resulta em uma forte redução de sua virulência em tomate e fava. PGs são um importante fator de patogenicidade em outros fungos como *Aspergillus flavus*, *Alternaria citri* e *Claviceps purpurea* e por bactérias como *Agrobacterium tumefaciens* e

Ralstonia solanacearum (JUGE, 2006; DI MATTEO *et al*, 2006; FREDERICI *et al*, 2006).

As substâncias pécticas são compostas por repetidas unidades de ácido galacturônico negativamente carregado, cujo grupo carboxila é freqüentemente esterificado com grupo metil, neutralizando as cargas negativas. A porcentagem de ácido galacturônico metilado, assim como a seqüência e posição das unidades metiladas variam com o ciclo de vida da planta e de um tipo de planta para outra. Portanto, o patógeno capaz de secretar uma bateria de pectinases com semelhante mecanismo de ação, porém, que reconheçam diferentes seqüências de unidades metiladas e não metiladas proporcionaria maior eficiência na quebra da pectina da parede celular e, conseqüentemente, maior sucesso no processo de infecção (HERRON *et al.*, 2000).

Múltiplas formas de poligalacturonases podem ser expressas a partir de um único gene ou de genes distintos. Caprari e colaboradores (1993) relatam a expressão de quatro endo-poligalacturonases pelo fungo patogênico *Fusarium moniliforme* derivadas da glicosilação diferencial de um único polipeptídeo, produto de um só gene. Por outro lado, *A. niger* possui uma família completa de genes codificantes de Endo-PG, e produz diversas isozimas que demonstram diferenças consideráveis com respeito à especificidade pelo substrato, velocidade de quebra e pH ótimo de atividade (BUSSINK *et al*, 1992; PARENICOVA *et al*, 1998). A atividade de poligalacturonase do fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea* é resultado da ação de várias isozimas que têm sido separadas ou purificadas após o crescimento deste fungo patogênico sob diferentes condições de cultivo (RHA *et al.*, 2001; CRUICKSHANK e WADE 1980; MAGRO *et al.*, 1980; DI LENNA e FIELDING 1983; JOHNSTON e WILLIAMSON 1992; TOBIAS *et al.*, 1993; TOBIAS *et al.* 1995; LEE *et al.*, 1997).

A maioria das enzimas degradadoras de parede ocorre em grandes famílias multigênicas exibindo diversos padrões de expressão, sugerindo especialização funcional (COUTINHO *et al*, 2003). Estas famílias

gênicas surgiram a partir de processos de duplicação de genes. Genes duplicados, que freqüentemente são ligados em *tandem* (seqüência de genes), podem surgir de erros despercebidos durante a replicação do DNA ou erros no reparo de quebras da dupla fita de DNA. Podem ocorrer eventos de duplicação de *tandem*. A duplicação de um gene seguida de diferenciação pode dar origem a um novo gene funcional. Cada duplicação de genes em *tandem* cria uma oportunidade única para promover a expansão de uma família gênica (CARROLL *et al*, 2006). Os modos pelos quais as duplicações gênicas deram origem a novos genes funcionais ao longo do curso da evolução permanecem pobremente compreendidos (HUGHES e FRIEDMAN, 2003).

Todos os genes em uma dada família gênica compartilham seqüências similares e por isso são chamados homólogos. Estes genes compartilham um ancestral comum. Temos dois tipos de genes homólogos:

- Ortólogos: encontrados em espécies diferentes. Derivados de um único gene de um ancestral comum. São fruto de um processo de divergência.
- Parálogos: encontrados no genoma de uma mesma espécie e são derivados de eventos de duplicação em um único genoma. São fruto de eventos de duplicação seguidos de um processo de divergência intra-específica.

Devido à complexidade da parede celular vegetal e, correspondentemente, dos sistemas enzimáticos envolvidos na sua degradação, na maioria dos casos, a inativação de um único gene que expressa enzimas que degradam a parede celular vegetal não tem influência na virulência ou patogenicidade dos fungos (TUDZYNSKI e TUDZYNSKI, 1998; TUDZYNSKI e TUDZYNSKI, 2000). Somente poucos casos são relatados em que a perda de um gene específico de enzimas que degradam a parede celular tem impacto significativo na patogenia do fungo. Shieh e colaboradores (1997) demonstraram que uma endo-poligalacturonase de um patógeno oportunista, *Aspergillus flavus*, está envolvida na infecção de algodão. Ten Have (1998)

relata que a deleção de um dos seis genes de endo-poligalacturonases (Bcpg 1) do fungo *Botrytis cinerea* leva a redução da virulência do fungo no tomate e na maçã (OESER *et al.*, 2002).

Em contrapartida ao fato de que a maioria dos microrganismos fitopatogênicos secreta uma série de enzimas capazes de despolimerizar polissacarídeos da parede celular do hospedeiro, as plantas desenvolveram uma bateria diversificada de respostas defensivas, incluindo proteínas inibidoras dessas enzimas. Elas incluem proteínas inibidoras de pectinases, como poligalacturonases, pectina-metil-esterases, e pectina-liases (JUGE, 2006). Proteínas inibidoras de poligalacturonases (PGIPs) são proteínas extracelulares vegetais ricas em leucina que se ligam especificamente e inibem poligalacturonases de fungos. A interação com as PGIPs limitam o potencial destrutivo das poligalacturonases, e podem engatilhar as respostas de defesa das plantas induzidas pelos oligogalacturonídeos resultantes da ação dessas PGs. Um elevado grau de polimorfismo é encontrado tanto em PGs quanto em PGIPs (DI MATTEO *et al.*, 2006).

Muitas plantas produzem PGIPs que reconhecem e inibem PGs de fungos e insetos especificamente (DE LORENZO e FERRARI, 2002; D'OVIDIO *et al.*, 2004). A interação entre PGs e PGIPs limita o potencial destrutivo das PGs e leva ao acúmulo de oligogalacturonídeos eliciadores da síntese de fitoalexinas, etileno e lignina (RIDLEY *et al.*, 2001). Fitoalexinas são compostos antimicrobianos de baixa massa molecular que são sintetizados e acumulados em vegetais após a exposição a microrganismos ou agentes abióticos (MERT-TURK, 2002; PAXTON, 1980; VAN ETEN *et al.*, 1994).

PGIPs interagem com PGs formando complexos biomoleculares. Patógenos desenvolveram diferentes PGs para maximizar seu potencial ofensivo, em contrapartida os vegetais desenvolveram várias PGIPs com diferentes especificidades para neutralizar a maioria das formas de PGs existentes na natureza (FREDERICI *et al.*, 2006). Parece razoável aceitar que se trata, portanto, de uma coevolução.

A eletroforese é o método mais comumente usado para distinção de múltiplas formas de enzimas (NAGAO *et al*, 1992; FERNADEZ-LOPEZ *et al*, 1994; HICKS, 1995, MITCHELL *et al*; 1995, ABE *et al*, 1997), e oferece vantagens como rapidez, ampla aplicabilidade, alto grau de resolução e evita as conseqüências artificiais do manuseio ou purificação das enzimas (PUGSLEY e SCHWARTZ, 1985). Zimogramas (eletroforese não desnaturante) têm sido usados com sucesso para quantificação de pectinases produzidas por fungos (SWEETINGHAM *et al* 1986; BALALI e KOWSARI, 2004, GANTOTTI e DAVIS, 1993). Entretanto, isozimas que apresentam idênticas mobilidades eletroforéticas não podem ser separadas, aparecendo como uma só banda no gel (SHAW, 1969). A cromatografia é um outro meio de identificação de isozimas, e também tem sido aplicada com sucesso (CAMPERI *et al*, 1996; SILVA *et al*, 2002, VACIK e TOREN, 1982, McMILLAN *et al*, 1992).

A produção de diferentes isoformas de poligalacturonases também tem sido descrita para fungos mesofílicos saprófitas como, *Penicillium frequentans* (SAID *et al.*, 1991), *P. viridicatum* rfc3 (SILVA *et al.*, 2002), *P. italicum* (RIZZATTO, 1999), *Aspergillus carbonarius* (DEVI e RAO, 1996), *A. niger* (SINGH e RAO, 2002), *Polyporus squamosus* (PERICIN *et al.*, 1992). Entretanto, fungos termofílicos têm mostrado uma, ou no máximo três isoformas para PG (Martins *et al*, 2007 Martin *et al*, 2007 – dados não publicados). Desse modo, torna-se importante um estudo comparativo entre espécies fúngicas mesofílicas e termofílicas.

2.8 Aplicações de pectinases

A produção de pectinases ocupa em torno de 10% de toda a produção de preparados enzimáticos comerciais. Estas enzimas são amplamente usadas na indústria alimentícia na produção de sucos, bebidas de frutas e vinhos. (SEMENOVA *et al*, 2006).

Endo-PGs têm sido especialmente aplicadas para maceração e separação de células intactas, por hidrólise da lamela média, na preparação de sucos e purês vegetais. O preparo de batatas chips instantâneas e de suco de cenoura para alimentos de bebê requer a maceração e a separação de células íntegras. Este tratamento mantém as células intactas, vitaminas, cor e aroma são preservados e os conteúdos celulares são protegidos do oxigênio (LANG e DORNENBURG, 2000).

Os preparados enzimáticos comerciais usados no processamento de alimentos são tradicionalmente misturas de pectina-liases, polimetil esterases e poligalacturonases, que correspondem à maior fração do complexo pectinolítico nestes produtos. Estes preparados são predominantemente derivados de fungos. A maioria destes preparados é obtida de espécies do gênero *Aspergillus* (LANG e DORNENBURG, 2000; SEMENOVA *et al*, 2006).

Os *aspergillus* negros são particularmente aplicáveis para a produção de enzimas por várias razões: são capazes de secretar elevados níveis de proteínas, possuem boas propriedades fermentativas, permitindo produção de enzimas em larga escala e produzem uma ampla gama de enzimas, tanto com atividade Endo quanto Exo, que degradam polissacarídeos de parede celular vegetal. Diversos produtos destes fungos são classificados como seguros, permitindo que sejam utilizados em alimentos (DE VRIES, 2003). Como exemplo de *aspergilus* negros, pode-se citar *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. japonicus* e *A. aculeatus*.

Aspergillus niger é o fungo mais comumente utilizado para produção industrial de enzimas pectinolíticas possui o status GRAS (Generally Regarded as Safe), seus metabólitos podem ser usados seguramente (GUMMADI e PANDA, 2003). Estudos demonstraram que *A. niger*, quanto à sua patogenicidade, hipersensibilidade e produção de toxinas, é um organismo seguro para a produção de enzimas na indústria (SCHUSTER *et al*, 2002).

A maior aplicação industrial de pectinases é na extração e clarificação de sucos (JAYANI *et al*, 2005), aumentando a produção dos mesmos, facilitando a prensagem e a filtração (LANG e DORNENBURG, 2000). Pectinases de *Sporotrichium thermophile* aumentaram o rendimento na produção de sucos a partir da polpa de banana, uvas, maçã (KAUR *et al*, 2004). Pectinases aumentam também o rendimento na extração de polpa de frutas como, por exemplo, o cupuaçu (*Theobroma grandifolium*) (BASTOS *et al*, 2002).

Enzimas pectinolíticas são amplamente usadas em indústrias de processamento de frutas para hidrolisar substâncias pécticas (BUSTO *et al*, 2005), responsáveis pela turbidez, viscosidade e suspensão indesejáveis em determinados sucos.

O uso de enzimas pectinolíticas em vinificação está amplamente difundido por trazer uma série de benefícios à indústria vinícola (GRANELLA *et al*, 2005). Os mostos e vinhos tratados com estas enzimas assumem um melhor aspecto visual, com mais brilho (JAYANI *et al*, 2005; LANG e DORNENBURG, 2000).

As pectinases são também utilizadas para a modificação de pectinas purificadas para diferentes aplicações. Pectinas são amplamente utilizadas na preparação de geléias, compotas e outros alimentos gelatinosos (BARFOD, 1990). Na preparação destes alimentos o uso de pectinas de baixa metoxilação é preferível por várias razões: elas produzem um gel de baixa caloria, com ou sem açúcar, na presença de cátions bivalentes como Ca^{+2} . Pectinas de alta metoxilação requerem grandes quantidades de açúcar e pH baixo para formar gel. Além disso, pectinas de baixa metoxilação são quimicamente mais estáveis a umidade e ao calor do que as de alta metoxilação (HOEFER, 1991). Géis obtidos por pectinas de baixa metoxilação são mais macios e mais espalháveis do que os obtidos com pectinas de alta metoxilação (PILGRIM *et al*, 1991).

Há quatro modos de promover a desmetoxilação de pectinas: ácidos, álcalis, amônia em álcool e pectina-esterases. Nighojar e colaboradores (1995) relatam sucesso no uso de pectina-esterase imobilizada para diminuir o grau de metoxilação de pectinas.

Pectina e polissacarídeos pécticos estão emergindo como alimentos bioativos. A pectina de toronja (*grape-fruit*), usada industrialmente como um estabilizante de alimentos possui um importante papel na saúde (CERDA, 1987). Yamada (1995) encontrou dois diferentes polissacarídeos pécticos bioativos: bupleran 2IIb e 2IIc. Bupleuran 2IIc, que consiste principalmente de uma região de galacturona parcialmente ramificada, mostrou potente atividade antiúlcera (YAMADA *et al*, 1991). A digestão de bupleuran 2IIc com Endo-PG produz principalmente galacturono-oligossacarídeos e pequenas porções de regiões resistentes à enzima. A porção de carboidrato resistente à enzima resultante mostrou potente atividade estimuladora da secreção de interleucina 6 (IL-6) em células de ratos. IL-6 é uma citosina estimuladora da resposta imunológica. (GUO *et al*, 2000), o que pode indicar um papel para Endo-PG na produção de polissacarídeos e oligossacarídeos como fármacos (LANG e DORNENBURG, 2000).

Novas aplicações para oligogalacturonídeos (OGAs) foram demonstradas na última década. A degradação dos OGAs por PGs produz oligossacarídeos não digestivos, que não são hidrolisados ou absorvidos na porção superior do trato gastrointestinal. Estas substâncias afetam benéficamente o hospedeiro pela estimulação seletiva de espécies de bactérias naturalmente residentes no cólon. O favorecimento da microbiota residente do hospedeiro induz efeitos sistêmicos benéficos à saúde e reprime a colonização, o crescimento ou virulência de patogênicos (VORAGEM, 1998; CRTTENDEN e PLAINE, 1996).

Pectinases podem ser empregadas para produzir OGAs. Iwasaki e colaboradores (1998) reportaram uma eficiente degradação da pectina em produção contínua utilizando Endo-PG de *A. pulverulentus*.

O suco natural de laranja possui materiais em suspensão que lhe conferem um aspecto opaco. Esta opacidade é um indicador de autenticidade do suco. A pectina é o principal responsável pela estabilidade desta suspensão correspondendo a cerca de 32% dos materiais suspensos. Em sucos adulterados ou em imitações de suco de laranja, por motivos técnicos, a estabilidade da suspensão é proporcionada por hidrocolóides sintéticos ou diferentes do natural.

Um preparado com pectinases foi utilizado para detectar a substituição da pectina natural em sucos de laranja por outros hidrocolóides. Quando tratados com pectinases por 24 h a 50°C, sucos naturais apresentaram maior redução na sua absorbância a 650 nm do que misturas de suco natural com imitações. Enquanto o suco natural sofreu redução de 78% na absorbância, a imitação sofreu redução de apenas 5% e uma mistura com 80% de suco natural e 20% de imitação sofreu redução de 37% (KYRIAKIDIS, 1999).

Enzimas pectinolíticas estão envolvidas na remoção de material gomoso (degomagem) presente em fibras de juta, cânhamo, linho, ramie e casca de coco para aplicação têxtil (CHESSON, 1980; BRUHLMANN *et al*, 1994). A degomagem pode ser feita tanto pela aplicação de preparados pectinolíticos quanto por um processo de fermentação das fibras (retting), no qual microrganismos decompõem a pectina liberando a fibra da casca (SHARMA e ROBINSON, 1983, MOLINA *et al*, 2001).

Para a remoção deste material gomoso, composto principalmente de pectina e hemicelulose, Kapoor e colaboradores (2001) testaram três tratamentos em fibras de ramie e cânhamo (*sunh hemp*): enzimático, químico e químico-enzimático, sendo que o terceiro foi mais eficiente, ficando demonstrada a remoção total do material gomoso não celulolítico das fibras.

Enzimas que degradam a parede celular vegetal podem ser usadas para extração de óleos vegetais. Óleos de canola, coco, semente de girassol e oliva são tradicionalmente extraídos com solventes orgânicos, como o potencialmente cancerígeno hexano (KASHYAP *et al*, 2001). Ao degradar componentes de parede, como a pectina, estas enzimas facilitam a liberação do óleo.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a presença de isoformas de PG, com base em separação por tamanho das moléculas, são produzidas pelos fungos *Thermomyces lanuginosus* ROB, *Aspergillus fumigatus* N31, *Rhizomucor pusillus* A13.36, *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3112, em fermentação em estado sólido em farelo de trigo, assim como produzir PG em FES utilizando diferentes substratos por pelo menos uma das cepas termofílicas e caracterizar essa enzima.

3.2 Específicos

- Produzir poligalacturonase por *Thermomyces lanuginosus* ROB, *Aspergillus fumigatus* N31, *Rhizomucor pusillus* A13.36, *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3112 em fermentação em estado sólido usando farelo de trigo como substrato.
- Separar as PG produzidas pela diferença de massa molecular utilizando filtração em gel SEPHADEX.
- Determinar a termoestabilidade das principais frações de pectinases obtidas.

- Estudar a produção da PG pela cepa termofílica escolhida como a produtora da PG mais termoestável, em outros substratos como bagaço de laranja, farelo de algodão e misturas de farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar.
- Caracterizar PG mais termoestável quanto a:
 - a) pH e temperatura ótimos de atividade;
 - b) Estabilidade da enzima, quando em ausência de substrato, a variações de pH e temperatura;
 - c) Especificidade pelo substrato (pectinas de alta e baixa esterificação);

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Os fungos utilizados foram os microrganismos mesofílicos *Aspergillus niger* NRRL 3112 e *Penicillium italicum* IZ 1584, o termofílico *Aspergillus fumigatus* N31 e os termofílicos *Rhizomucor pusillus* A13.36 e *Thermomyces lanuginosus* ROB.

4.2. Meio de manutenção

Os microrganismos foram mantidos em meio Sabouraud, os mesofílicos a 7°C (em geladeira) e os termofílicos a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), sob água estéril coberta com camada de óleo mineral.

4.3 Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5 g de farelo de trigo esterilizado. Os microrganismos mesofílicos e termofílicos foram cultivados a 27°C e 45°C, respectivamente, em incubadoras B.O.D.

Nas FES realizadas com os fungos *Rhizomucor pusillus* A13.36 e *Thermomyces lanuginosus* ROB, o material foi inoculado com 5 mL de

suspensão micelial em água estéril (aproximadamente 5 mg de massa micelial seca/g substrato). Nas FES realizadas com *Aspergillus niger* NRRL 3112, *Aspergillus fumigatus* N31, *Penicillium italicum* IZ 1584 o material foi inoculado com 5 mL de suspensão de esporos (aproximadamente 10^7 esporos/g de substrato). Os inóculos utilizados foram obtidos a partir de culturas de 7 dias em meio Sabouraud para os fungos *A. niger*, *P.italicum* e *T. lanuginosus*, e culturas de 4 dias para *R. pusillus* e *A. fumigatus*.

Após a inoculação, 7 mL de solução nutriente foram adicionados em cada frasco, obtendo-se umidade de 70%, considerando-se o volume de solução nutriente e de água do inóculo. A solução nutriente empregada foi preparada com a seguinte composição: 0,2% $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05% de solução micronutriente (0,02% $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02% $\text{CuSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,005% $\text{MgSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,005% CaCl_2). O pH foi ajustado para 5,0 com $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Os cultivos foram realizados, a princípio, por períodos de 10 a 15 dias. As fermentações foram realizadas em duplicatas.

Dois frascos Erlenmeyer foram retirados a cada 24 h e, ao material fermentado de cada frasco, foram adicionados 40 mL de água destilada. Em seguida, o material foi homogeneizado com auxílio de um bastão de plástico, agitado por 30 min em *shaker* a 100 rpm, filtrado em gaze e centrifugado por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

4.4 Medida da atividade de poligalacturonase

A atividade das Exo-poligalacturonases foi avaliada numa mistura contendo 0,9 mL de tampão acetato de sódio 0,2 mol/L, pH 5,0, contendo 1% de pectina (KELCO, 64-72% de esterificação) e 0,1 mL de solução enzimática bruta. O açúcar redutor liberado (ácido D-galacturônico), após a incubação da mistura de reação a 50°C por 10 min, foi quantificado pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) proposto por Miller (1959). Neste

trabalho, uma unidade de PG foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácido galacturônico por minuto, nas condições de reação.

A determinação da atividade endo das poligalacturonases foi obtida pela incubação de uma mistura de 6 mL de tampão acetato de sódio, 0,2 mol/L, pH 5,0, contendo 3% de pectina (Kelco) e 2 mL de solução enzimática por 10 min na temperatura de 50°C. Considerou-se como uma unidade de enzima a quantidade de enzima capaz de reduzir em 50% a viscosidade da mistura de reação nas condições de ensaio. As leituras de viscosidade foram realizadas em viscosímetro (FREITAS *et al*, 2006).

4.5 Determinação de proteínas totais

A determinação dos teores de proteínas totais da solução enzimática bruta e das frações isoladas foi feita através do método de Lowry, adaptado por Hartree (HARTREE, 1972), usando soro albumina bovina como padrão.

4.6 Fracionamento e isolamento das frações de PGs

As soluções enzimáticas brutas foram dialisadas contra 4 L de tampão acetato de sódio 10 mmol/L pH 5,0 a 4°C, por 24 h, com 3 trocas sucessivas após, respectivamente, 12, 18 e 24 h de diálise. O material dialisado foi congelado em nitrogênio líquido e posteriormente liofilizado. O preparo da amostra se deu pela ressuspensão do material liofilizado em tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 5,0.

As enzimas brutas, dialisadas e concentradas, foram submetidas à cromatografia de filtração em gel em coluna contendo gel Sephadex G-100 (Pharmacia). Para a eluição utilizou-se tampão acetato de sódio 50 mmol/L, pH 5,0. O fluxo na coluna foi ajustado em 18 mL/h, sendo

coletados 3 mL por tubo. A atividade de poligalacturonase foi determinada nas frações eluídas.

4.7 Zimograma

Para a eletroforese, foi empregado um sistema constituído por gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 4%, em placa de 10 x 15cm.

O gel de separação foi composto por 10 mL de água desionizada, 0,01g de pectina de citrus Kelco com 64-72% de esterificação, 6,6 mL de solução contendo 30% de acrilamida e 0,8% de NN-metileno-bisacrilamida, 5mL de tampão TRIS-HCl 1,5 M, pH 8,8, 0,3 mL de solução de persulfato de amônio a 0,2% e 20µL de temed. A mistura foi vertida na placa e, após a sua polimerização, adicionou-se a mistura para o gel de empilhamento constituída por 6 mL de água desionizada, 1,35 mL de solução contendo 30% de acrilamida e 1,6 % de NN-metileno-bisacrilamida, 2,5 mL de tampão TRIS-HCL 0,5 M, pH 6,8, 0,15 mL de solução de persulfato de amônio a 0,2% e 10 µL de temed.

Tampão tris-glicina (pH 8,7) foi usado nas cubas com eletrodos para a corrida. Antes da aplicação das amostras, fez-se uma pré-eletroforese do gel por 30 min.

As amostras foram preparadas misturando-se 10 µL das soluções enzimáticas e 3 µL de azul de bromofenol 0,05% em tampão de corrida do gel. As amostras foram aplicadas para migrarem no sentido do cátodo. A eletroforese foi feita a 4°C, em câmara fria, a uma força constante de 25 W. Após a eletroforese, cada gel foi lavado com água destilada e incubado por 30 min em cubas com 300 mL tampão acetado de sódio 200 mmol/L a 50°C. Decorrido o período de incubação, os géis foram lavados com água destilada e incubados, sob fraca agitação em *shaker*, em solução 0,01% de vermelho de rutênio por tempo suficiente para a revelação das bandas. Após a

revelação, os géis foram lavados com água destilada e secados em papel celofane.

4.8 Determinação do pH e temperatura ótimos para a atividade das enzimas

O comportamento da atividade das enzimas em função do pH foi estudado incubando-se a solução enzimática e substrato em solução de acetato de sódio 0,2 mol/L (pH 3,0), tampões acetato de sódio 0,2 mol/L (pH 3,5 a 5,5), McIlvaine (pH 5,5 a 7,5) e glicina (pH 8,5 a 10,5). Para pHs 8,0 e 11,0 foram empregadas soluções obtidas a partir de tampões glicina, cujos valores de pH foram ajustados, respectivamente, com glicina e NaOH. A atividade foi dosada a 50°C.

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

4.9 Determinação da estabilidade das enzimas frente a variações de temperatura e pH

As enzimas foram mantidas por 1 h, em ausência de substrato, em temperaturas de 0°C a 80°C. Após esse período, foram tomadas amostras para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperatura ótimos.

A estabilidade das enzimas em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-as em tampões (0,2 mol/L) com pH variando de 3,0 a 11,0, em ausência de substrato, a 25°C, por 24 h. Após esse período, foram tomadas amostras para ensaiar a atividade enzimática nas condições de pH e temperatura determinados como ótimos para a atividade das enzimas.

4.10 Avaliação da especificidade pelo substrato

A atividade de PG das amostras enzimáticas foi determinada em pectina de citrus de baixa e alta esterificação (SIGMA, com respectivamente 10% e 92% de esterificação), pectina de maçã (SIGMA) e pectina com 64-72% de esterificação (KELCO), seguindo-se o procedimento descrito no item 4.4.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de PGs em FES em farelo de trigo

Os fungos mesofílicos *A. niger* e *P.italicum* foram cultivados em temperatura de 27°C e os termofílicos em temperatura de 45°C.

A atividade de PG foi detectada no meio de cultivo de *A.niger* a partir do 2º dia de cultivo, sendo a máxima atividade observada entre o 9º e o 13º dia (24-25 U/g) (Figura 03).

Castilho e colaboradores (2000) obtiveram, em FES, um pico de produção de PG por *A.niger* em 70 h em cultivo a 35°C em meio contendo uma mistura de farinha de trigo e farelo de soja.

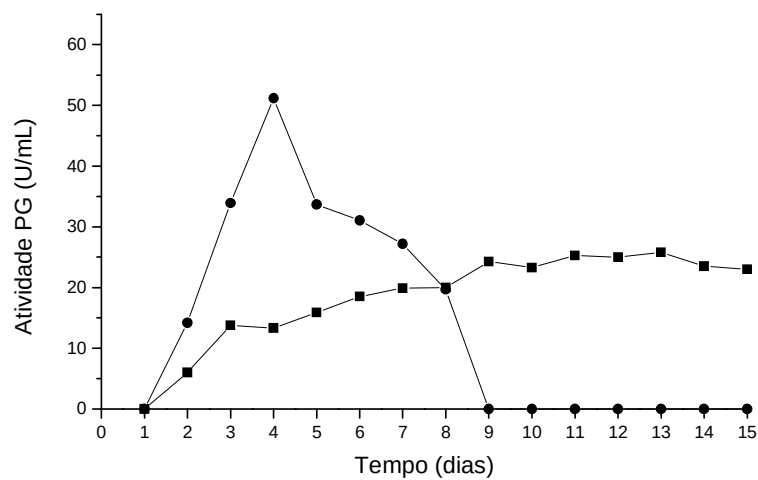


Figura 03: Produção de PG pelos fungos mesofílicos *A. niger* e *P. italicum*. Cultivo a 27°C em farelo de trigo.
 -■- *A. niger*, -●- *P. italicum*

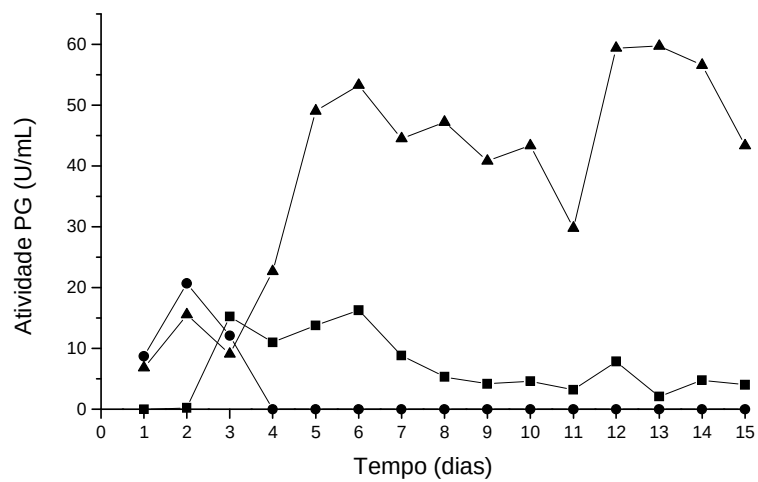


Figura 04: Produção de PG pelos fungos termofílicos *R. pusillus* e *T. lanuginosus*.e termofílico *A. fumigatus*. Cultivo a 45°C em farelo de trigo.
 -■- *R. pusillus*, -●- *T. lanuginosus*, -▲- *A. fumigatus*

O fungo *P. italicum* apresentou atividade a partir do 2º dia de fermentação. A atividade cresceu linearmente até o 4º dia, quando foi obtido o pico de produção de 51 U/g. Após atingir o valor máximo, a atividade decaiu progressivamente extinguindo-se no 9º dia (Figura 03).

O tempo para obtenção do pico de atividade foi semelhante ao observado para outras espécies de *Penicillium*, e a produção de PG foi alta em comparação com o reportado para outras linhagens. Pode-se citar, por exemplo, *Penicillium* sp ECG5 que produziu 26 U/g em 4 dias de fermentação a 30°C em bagaços de cana, laranja e farelo de trigo (MARTIN *et al*, 2004), *P. viridicatum* RFC3 com produção de 30 U/g em 4 dias em farelo de trigo a 30°C (SILVA *et al*, 2002),

A Figura 04 mostra que, para o fungo termodúrico *A. fumigatus*, detectou-se atividade enzimática a partir do primeiro dia, sendo obtidos dois picos de produção, um no 6º dia (53,3 U/g) e outro do 12º ao 13º dia (59,4 U/g). *A. fumigatus* foi considerado o melhor produtor de PG dentre todos os fungos empregados no presente trabalho.

Segundo Freitas e colaboradores (2006), *A. fumigatus* produziu boas quantidades de PG em FES empregando como fontes de carbono o farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja. O fungo chegou a produzir 80 U/g após 3 dias de incubação a 45°C em meio de cultivo composto por farelo de trigo e bagaço de laranja.

O fungo *R. pusillus* apresentou produção expressiva a partir do 3º dia, atingindo um pico de produção de 16,3 U/g no 6º dia de fermentação (Figura 04).

Há poucos relatos na literatura de produção de PG por fungos do gênero *Rhizomucor*. Martin (2006), estudou a produção de PG pelo fungo *Rhizomucor* sp N 31 em farelo de trigo a 45°C. A máxima produção (98 U/g) foi obtida no 2º dia de fermentação, mantendo-se constante até o 8º dia.

O fungo *T. lanuginosus* apresentou produção a partir do primeiro dia, atingindo um pico de produção de 20,7 U/g no 2º dia de fermentação (Figura 04). Este resultado é semelhante ao observado por

Sathish-Kumar e Palanivelu (1999) que obtiveram pico de produção de poligalacturonase em 40 h de fermentação com esta espécie em meio mínimo com 1% de pectina e 1% de sacarose. Em um outro estudo, realizado com 17 linhagens de *T. lanuginosus*, Puchart e colaboradores (1999) observaram produção de pectinases por 14 linhagens durante o crescimento em polpa de beterraba, com picos de produção após o 3º ou 4º dia de fermentação.

Diferentemente dos demais fungos, para os quais se observou atividade enzimática durante vários dias de cultivo, para *T. lanuginosus* só se observou atividade do 1º ao 3º dia de fermentação.

5.2 Caracterização físico-química das PGs nas soluções enzimáticas brutas

As amostras enzimáticas utilizadas para a caracterização físico-química das PGs foram aquelas obtidas no tempo de cultivo em que se deu o pico de atividade enzimática para cada fungo. Assim, foram usadas amostras do 11º dia de fermentação para *A. niger*, 4º dia para *P. italicum*, 12º dia para *A. fumigatus*, 6º dia para *R. pusillus* e 2º dia para *T. lanuginosus*.

5.2.1 Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade das PGs

O pH é um importante fator de influência sobre a atividade de enzimas. O pH do meio afeta o grau de ionização dos resíduos de aminoácidos das proteínas (DIXON, 1952), causando variações de carga total, variações conformacionais ou alterações no sítio ativo das enzimas. Podem ocorrer também alterações no substrato (GOMES *et al*, 2006). As alterações podem ser irreversíveis, podendo causar inativação definitiva da enzima.

A solução enzimática de *Aspergillus niger* apresentou atividade de PG em uma ampla faixa de pH (3,0-7,0), com maior atividade em pH 4,5. A solução enzimática mostrou-se estável em faixa de pH 3,0-8,5, chegando a manter mais de 90% da atividade original em pH 3,0-7,0 (Figura 05).

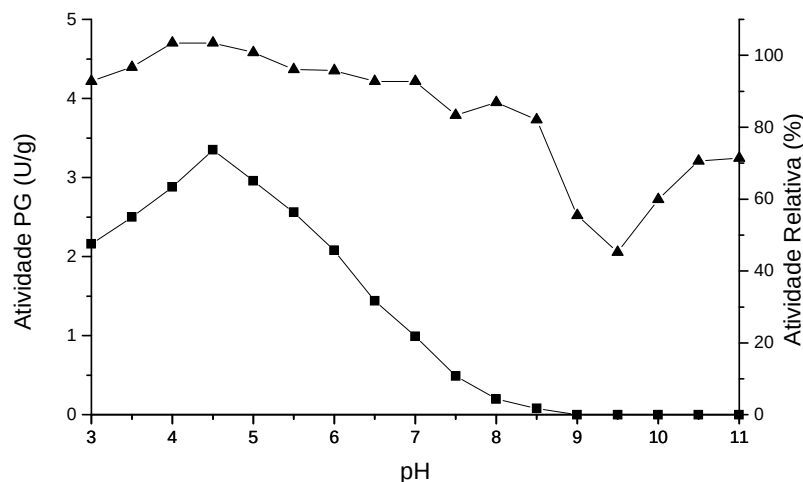


Figura 05: Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade de PG de solução enzimática bruta obtida no 11º dia de cultivo de *A.niger* em farelo de trigo. Tampões: acetato 3,5 – 5,5, McIlvaine 6,0 – 7,5, glicina 8,0 – 11.
 — ■ — Atividade de PG nas condições de reação descritas — ▲ — Estabilidade de PG frente às variações de pH, quando em ausência de substrato. Reação realizada em pH ótimo (4,5).

Alguns autores, em experimentos com PGs de *A. niger*, relatam valores de pH ótimo para atividade PG iguais ou semelhantes ao aqui apresentado, como por exemplo Labavitch e Rae (1978) e Acuña-Argüelles e colaboradores (1994) que relatam pH ótimo 4,5 e 4,5-5,0, respectivamente. Há também relatos de valores de pH ótimo diferentes, Benkova (1967), por exemplo, detectou atividade máxima de PG em pH 6,5-7,0, enquanto que Heinrichova e Dzurova (1981) obtiveram melhor atividade em pH 4,0. Como já foi exposto no item 2.7, sabe-se que *A.niger* expressa simultaneamente diversas pectinases (BUSSINK *et al*, 1992; MARKOVIC e JANECEK, 2001) que podem diferir quanto ao pH ótimo de atividade. Assim, podemos considerar que para espécies como *A.niger* que expressam diferentes PGs, o pH ótimo do complexo pectinolítico pode variar dependendo das proporções em que estas enzimas são expressas.

A PG produzida por *Penicillium italicum* apresentou atividade em uma ampla faixa de pH (4,0 a 8,5) (Figura 06). *P. italicum* também expressa diferentes PGs simultaneamente, que podem diferir quanto ao pH ótimo (RIZZATTO, 2004), sendo esta a possível razão para ocorrência do pH ótimo na faixa de pH 5,0-6,5.

A literatura relata que outras espécies do mesmo gênero como, por exemplo, *Penicilium sp* (MARTIN *et al*, 2004), *P. viridicatum* (SILVA *et al*, 2002) e *P. oxalicum* (T. IKOTUN, 1984) também apresentaram atividade ótima em pH 5,0, ou próximo a este valor, como *P. capsulatum* com pH ótimo 4,7 (GILLESPIE *et al*, 1990).

As PGs apresentaram boa estabilidade ao pH. A atividade relativa manteve-se sempre superior a 80% da atividade original em pH entre 3,5 e 11,0. Na faixa de pH entre 3,5 e 7,0 conservou-se mais de 90% da atividade original (Figura 06). Esta estabilidade demonstrada pela enzima associada ao fato de que ela apresentou-se bastante ativa em uma ampla faixa de pH (4,5-7,0) é interessante sob o ponto de vista da sua aplicação em processos industriais. Isso porque uma enzima pode ser estável, porém inativa, em uma determinada faixa de pH, o que limita a sua aplicação.

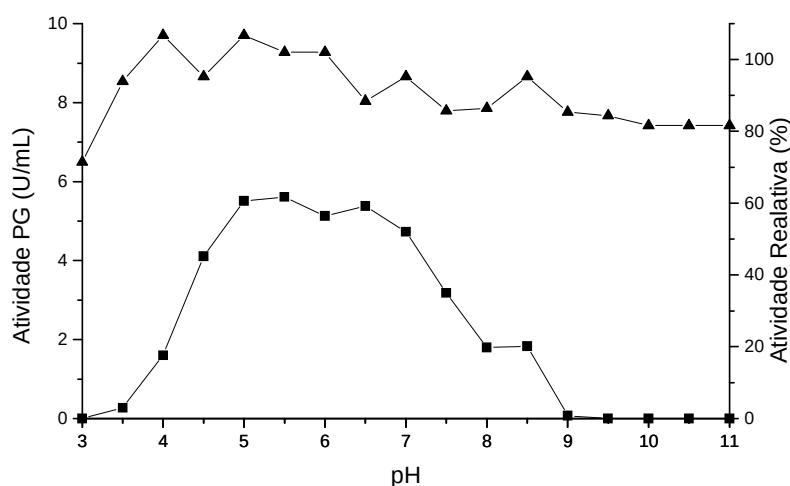


Figura 06: Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade de PG de solução enzimática bruta obtida no 4º dia de cultivo de *P. italicum* em farelo de trigo.

Tampões: acetato 3,5 – 5,5, McIlvaine 6,0 – 7,5, glicina- 8,0 – 11.

— ■ — Atividade de PG nas condições de reação descritas — ▲ — Estabilidade de PG frente às variações de pH, quando em ausência de substrato. Reação realizada em pH ótimo (5,0).

Para *Aspergillus fumigatus*, considerado fungo termodúrico, detectou-se atividade de PG em faixa de pH de 4,0 a 6,0. A atividade, porém, foi ótima em pH 5,0-5,5 (Figura 07). A enzima teve mais de 80% de sua atividade original preservada na faixa de pH 4,0-11,0. O mesmo valor de pH ótimo e um semelhante comportamento frente às variações de pH para PG de *A. fumigatus* foi obtido por Freitas e colaboradores (2006) e por Phutela e colaboradores (2005).

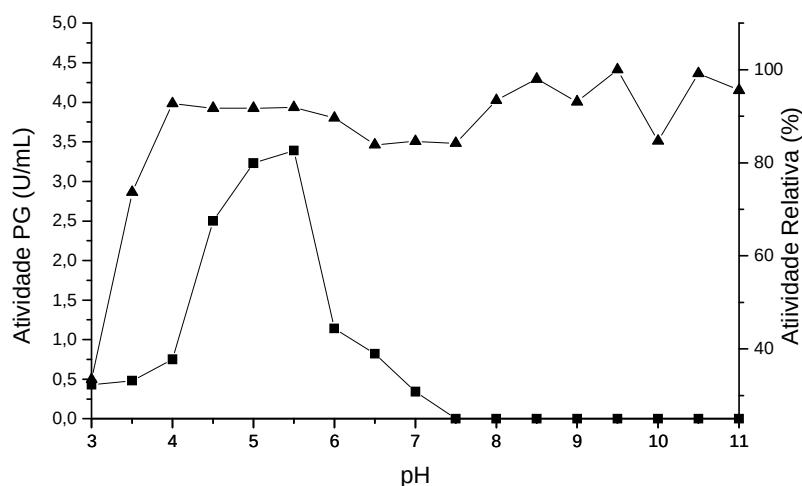


Figura 07: Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade de PG de solução enzimática bruta obtida no 12º dia de cultivo de *A. fumigatus* em farelo de trigo.

Tampões: acetato 3,5 – 5,5, McIlvaine 6,0 – 7,5, glicina 8,0 – 11.

— ■ — Atividade de PG nas condições de reação descritas —▲— Estabilidade de PG frente às variações de pH, quando em ausência de substrato. Reação realizada em pH ótimo (5,5).

A PG do fungo *Rhizomucor pusillus* apresentou atividade máxima em pH 5,0 (Figura 08). Apesar de *R. pusillus* ter sido isolado pela primeira vez há mais de um século, sendo o primeiro fungo termofílico a ser descrito (MAHESHWARI et al., 2000), há poucos relatos na literatura de estudos de PGs desta espécie. Foda e colaboradores (1984) relatam maior atividade de PG produzida por esta espécie em pH 4,5. Henricson e colaboradores (1999) relataram pH ótimo 6,0 para pectinases produzidas por *R. pusillus*.

A estabilidade de PG foi superior a 80% em pH 3,0 a 8,5. A enzima perdeu drasticamente sua atividade em pHs superiores a 8,5 (Figura 08).

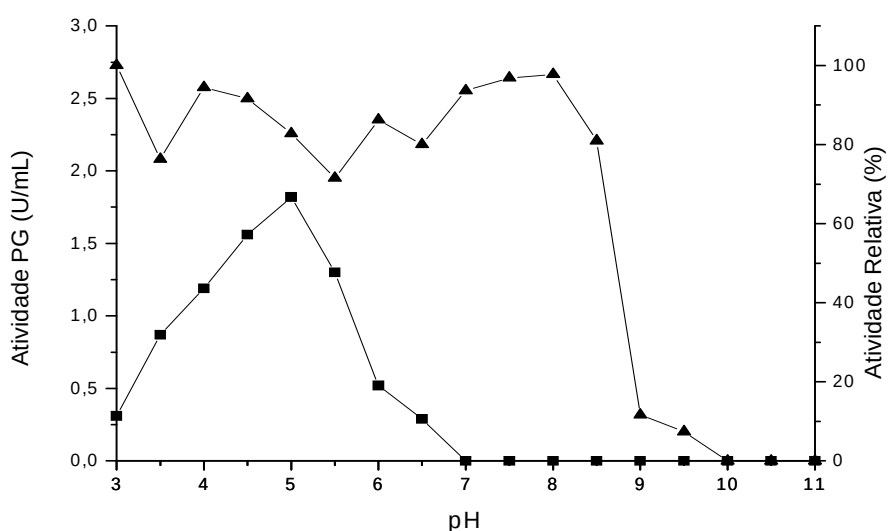


Figura 08: Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade de PG de solução enzimática bruta obtida no 6º dia de cultivo de *R. pusillus* em farelo de trigo.

Tampões: acetato 3,5 – 5,5, McIlvaine 6,0 – 7,5, glicina 8,0 – 11.

— ■ — Atividade de PG nas condições de reação descritas —▲— Estabilidade de PG frente às variações de pH, quando em ausência de substrato. Reação realizada em pH ótimo (5,0).

Para a PG de *T. lanuginosus* (Figura 09), observou-se um pico de atividade em pH 5,0 e outro em pH 7,5, indicando a ocorrência de enzimas com diferentes valores de pH ótimo. Sathish-Kumar e Palanivelu (1999) reportaram pH ótimo de 5,5 para uma PG purificada produzida por esta espécie.

A atividade de PG foi estável em uma ampla faixa de pH. A atividade residual só foi inferior a 85% da atividade original na faixa de pH de 7,0 a 8,0 (Figura 09).

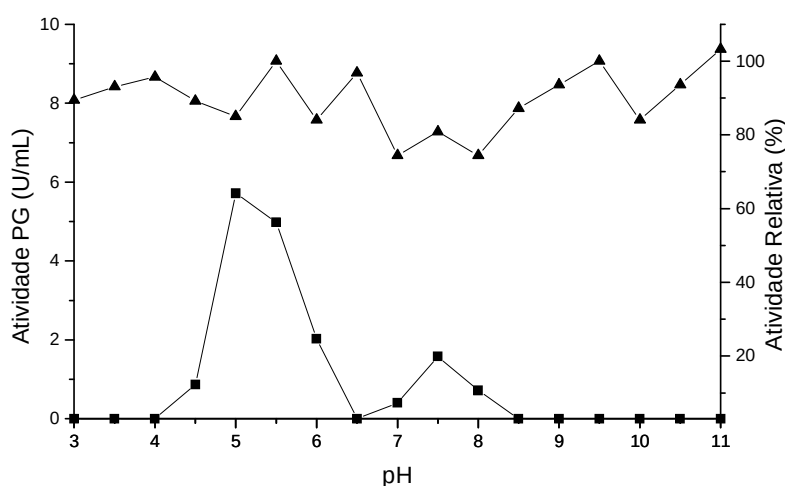


Figura 09: Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade de PG de solução enzimática bruta obtida no 2º dia de cultivo de *T. lanuginosus* em farelo de trigo.

Tampões: acetato 3,5 – 5,5, McIlvaine 6,0 – 7,5, glicina 8,0 – 11.

— ■ — Atividade de PG nas condições de reação descritas —▲— Estabilidade de PG frente às variações de pH, quando em ausência de substrato. Reação realizada em pH ótimo (5,0).

5.2.2 Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade das PGs

A Figura 10 mostra que, para *A. niger*, a temperatura ótima para atividade das PGs foi 50°C. Acima de 70°C não se detectou atividade enzimática. O aumento da temperatura de incubação causou progressiva redução da estabilidade do complexo enzimático, quando este foi mantido por 1 h em ausência de substrato. A 50°C, foi mantido aproximadamente 70% da atividade original. A 60°C, apenas 16,20% da atividade original foi preservada.

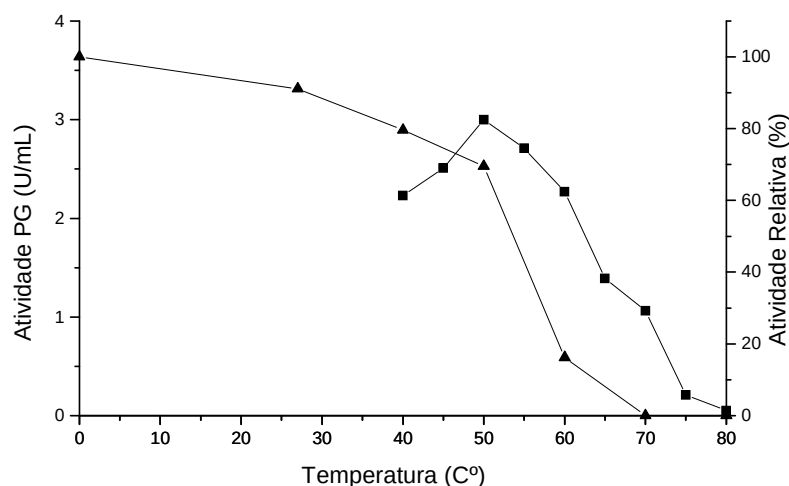


Figura 10: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG em solução enzimática bruta obtida no 11º dia de cultivo de *A. niger* em farelo de trigo.

Tampão: acetato de sódio pH 4,5.

— ■ — atividade de PG nas condições de reação descritas —▲— estabilidade de PG após 1 h nas temperaturas indicadas, em ausência de substrato.

A PG produzida por *P. italicum* apresentou atividade máxima em temperatura de 45°C. Dentre todos os fungos estudados no presente trabalho, *P. italicum* foi o que produziu PG menos termooestável. A 0°C, 100% da atividade original foi mantida, porém após incubação por 1 h a 27°C, em ausência de substrato, a atividade foi reduzida para 63,80%. A incubação a 60°C inativou totalmente a PG (Figura 11).

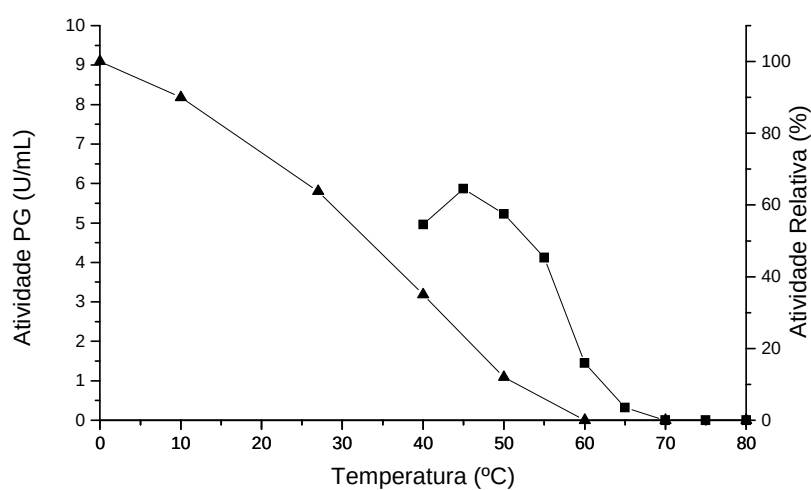


Figura 11: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG em solução enzimática bruta obtida no 4º dia cultivo de *P. italicum* em farelo de trigo.

Tampão: acetato de sódio pH 5,0.

— ■ — atividade de PG nas condições de reação descritas — ▲ — estabilidade de PG após 1 h nas temperaturas indicadas, em ausência de substrato.

A Figura 12 mostra que, para as PGs de *A. fumigatus*, a temperatura ótima de atividade foi na faixa de 50-60°C. A partir de 60°C a atividade caiu bruscamente tornando-se desprezível a 80°C. Com relação a termoestabilidade em ausência de substrato, houve manutenção de praticamente 100% da atividade original até 50°C, com drástica perda de atividade em temperaturas superiores a esta. A 60°C a estabilidade foi inferior a 10%.

A comparação dessa termostabilidade com aquelas observadas para as PGs das soluções enzimáticas obtidas pelos cultivos de *A. niger* e *P. italicum*, fungos tipicamente mesofílicos, sugere que a propriedade termodúrica de *A. fumigatus* leve à produção de PGs mais termoestáveis.

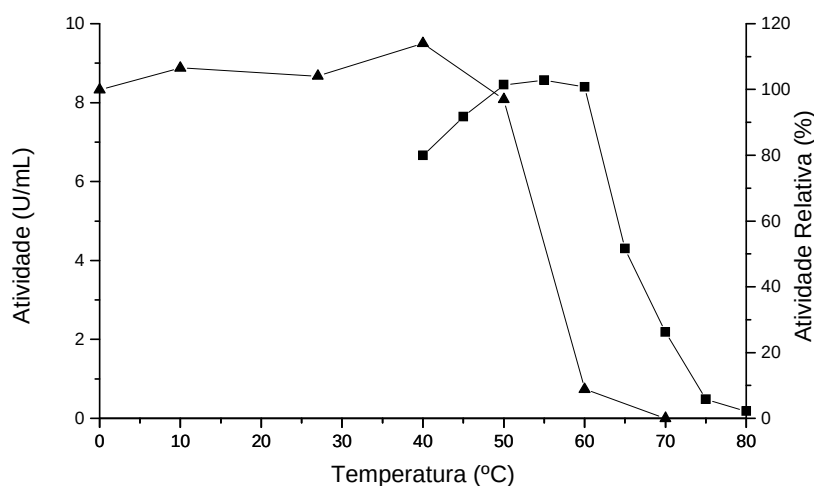


Figura 12: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG em solução enzimática bruta obtida no 12º dia de cultivo de *A. fumigatus* em farelo de trigo.

Tampão: acetato de sódio pH 5,5.

— ■ — atividade de PG nas condições de reação descritas — ▲ — estabilidade de PG após 1 h nas temperaturas indicadas, em ausência de substrato.

A Temperatura ótima para atividade de PGs de *R. pusillus*, fungo tipicamente termofílico, foi de 50°C a 60°C, com atividade ligeiramente maior a 60°C, similar ao observado para as PGs de *A. fumigatus*. (Figura 13). Este resultado corrobora o obtido por Foda e colaboradores (1984) que, em estudos realizados com *R. pusillus*, obtiveram máxima atividade de PG a 60°C. Com relação a termoestabilidade em ausência de substrato, as PGs foram estáveis até 40°C, preservando 80% da atividade original. Entretanto, as PGs perderam completamente a atividade quando incubadas a 50°C. Apesar deste fungo ser termofílico, a termoestabilidade foi baixa, sendo menor do que a estabilidade das enzimas de *A.niger* (Figura 10), que é mesofílico.

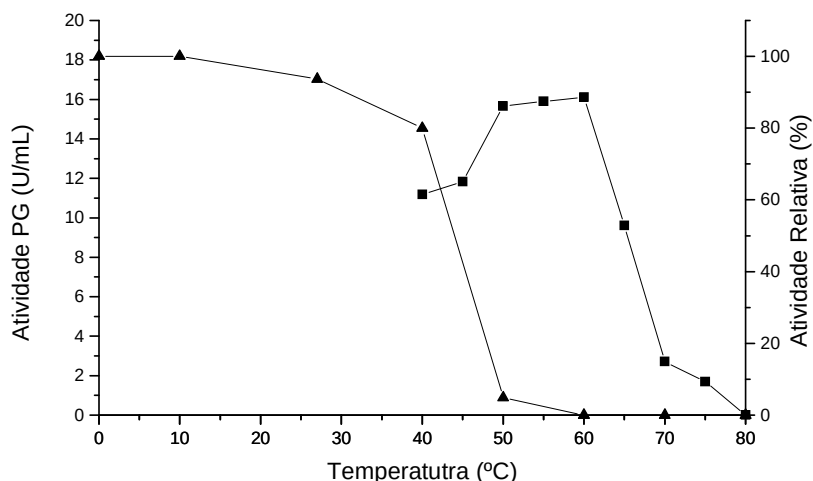


Figura 13: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG em solução enzimática bruta obtida no 6º dia de cultivo de *R. pusillus* em farelo de trigo.

Tampão: acetato de sódio pH 5,0.

— ■ — atividade de PG nas condições de reação descritas — ▲ — estabilidade de PG após por 1 h nas temperaturas indicadas, em ausência de substrato.

A máxima atividade de PG produzida por *T. lanuginosus* foi detectada a 70°C. Dentre todos os fungos, *T. lanuginosus* foi o que apresentou o mais elevado valor de temperatura ótima. A PG foi estável a 50°C em ausência de substrato, conservando nesta temperatura 89% da atividade original, porém, foi totalmente inativada a 60°C (Figura 14).

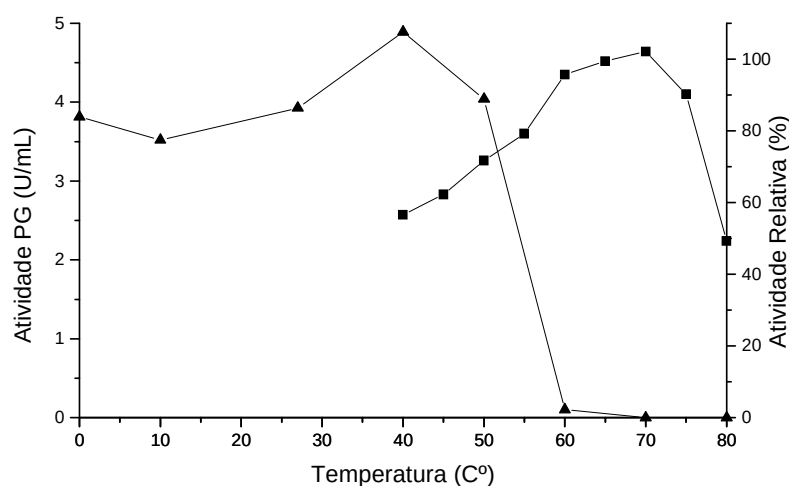


Figura 14: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG em solução enzimática bruta obtida no 2º dia de cultivo de *T. lanuginosus* em farelo de trigo. Tampão: acetato de sódio pH 5,0.
 — ■ — atividade de PG nas condições de reação descritas —▲— estabilidade de PG após 1 h nas temperaturas indicadas, em ausência de substrato.

Os dados de temperatura ótima para atividade e de termoestabilidade das PGs brutas permitem concluir que existem diferenças de comportamento das enzimas dentro desses parâmetros, mesmo quando produzidas por espécies do mesmo gênero. A comparação entre estes parâmetros, tendo como fonte das enzimas fungos mesofílicos, termodúrico e termofílicos, leva-nos a inferir que a temperatura de crescimento do fungo tem correlação positiva com a temperatura ótima, porém, não é um fator que garante a termoestabilidade da enzima, pois, como se observou, o fungo termofílico *T. lanuginosus*, que cresceu a 45°C, apresentou PG menos termostável do que o mesofílico *A.niger*, que cresceu a 27°C.

Admitindo-se que enzimas mais termostáveis e com maiores valores de temperatura ótima conferem melhor adaptação às condições termofílicas, é possível inferir que a pressão seletiva sobre os microrganismos que se adaptaram à termofilia tenha sido no sentido de selecionar enzimas com tais características. Assim, a correlação positiva entre a temperatura de crescimento e a temperatura ótima de atividade enzimática pode estar relacionada a um processo de seleção natural. De fato, observou-se que os microrganismos termofílicos *T. lanuginosus* e *R. pusillus* e o termodúrico *A. fumigatus*, que cresceram a 45°C, apresentaram PGs com temperaturas ótimas mais elevadas do que os mesofílicos *A.niger* e *P. italicum*, que cresceram a 27°C.

Tabela 01: Propriedades das enzimas brutas caracterizadas

	pH ótimo	pH em que se preservou pelo menos 70% da atividade original	Temperatura ótima	Temperatura em que se preservou pelo menos 70% da atividade original
<i>A. niger</i>	4,5	3,0-8,5 e 10,5-11,0	50°C	50°C
<i>P. italicum</i>	5,0 e 6,5	3,0-11,0	45°C	10°C
<i>A. fumigatus</i>	5,0-5,5	3,0-11,0	50-60°	50°C
<i>R. pusillus</i>	5,0	3,0-8,5	60°C	40°C
<i>T. lanuginosus</i>	5,0	3,0-11,0	70°C	50°C

5.3 Determinação das atividades de Endo-PGs nas soluções enzimáticas brutas

A Figura 15 mostra as atividades de Endo-PG das soluções enzimáticas obtidas pelo cultivo dos 5 fungos em farelo de trigo. Os dados indicaram que *A. niger* e *T. lanuginosus* produziram as maiores quantidades de Endo-PG (17 U/mL e 18 U/mL, respectivamente), sendo, também, os fungos que, proporcionalmente, produziram a menor atividade de Exo-PG (Tabela 02), enquanto que *A. fumigatus* produziu enzimas com maior proporção de atividade de Exo-PG.

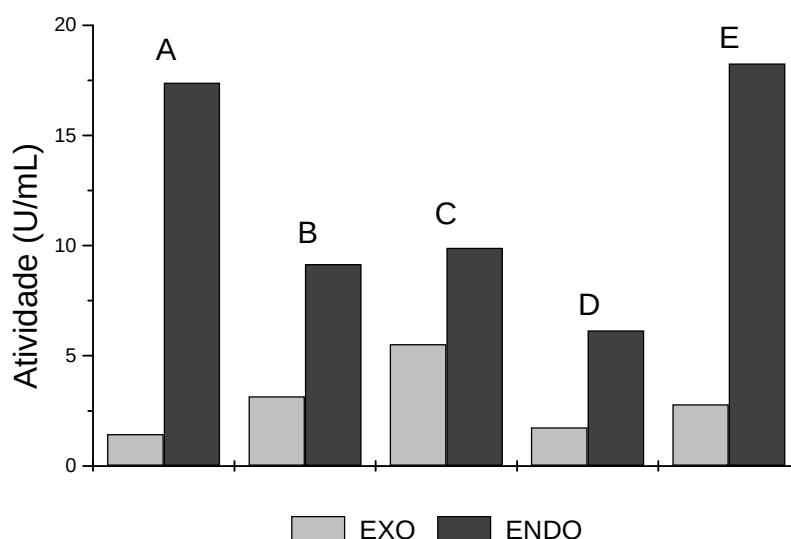


Figura 15: Atividades de Exo-PG e Endo-PG obtidas pelo cultivo dos mesofílicos e termofílicos em farelo de trigo: **A** - *A. niger* ; **B** - *P. italicum*; **C** - *A. fumigatus*; **D** - *R. pusillus*; **E** - *T. lanuginosus*.

A Tabela 02 mostra que a atividade de Endo-PG em *A. niger* foi 12 vezes maior que a de Exo-PG. A existência de uma família gênica de endopoligalacturonases em *A. niger* justifica este resultado (PARENICOVA *et al*, 1998).

Tabela 02: Razão entre os valores de atividade de Endo-PG e Exo-PG

Fungo	Razão entre atividades Endo/Exo
<i>A. niger</i>	12
<i>P. italicum</i>	2,9
<i>A. fumigatus</i>	1,8
<i>R. pusillus</i>	3,5
<i>T. lanuginosus</i>	6,5

5.4 Fracionamento das PGs por filtração em gel e zimogramas

Para avaliar as múltiplas formas de PGs produzidas por cada fungo, as amostras de solução enzimática bruta foram dialisadas, congeladas, liofilizadas e ressuspensas para serem aplicadas em coluna de gel Sephadex G-100, conforme descrito no item 4.6. Os géis foram preparados de acordo com o descrito no item 4.7. Foi utilizada pectina de citrus KELCO com 64-72%.

Para *Aspergillus niger*, foram aplicados 4mL de amostra da enzima obtida em 11 dias de cultivo do fungo, concentrada com 128,4 U de enzima. Detectou-se atividade enzimática a partir de 228mL até 552 mL de eluição. Pode-se observar 7 picos de atividade de PG eluída no cromatograma, indicando a presença de pelo menos 7 de PGs (Figura 16A). Este resultado é coerente com a literatura que relata a produção de diversas isozimas por *A. niger* (BUSSINK *et al*, 1992; PARENICOVA *et al*, 1998). Entretanto, essas frações não aparecem no zimograma (Figura 16B), no qual apenas uma banda foi detectada. É possível que o procedimento e as condições do experimento tenham levado à perda da atividade da enzima, pois como ficou demonstrado no item 5.2.1, as PGs de *A.niger* não foram estáveis no pH de corrida da eletroforese (pH 8,7).

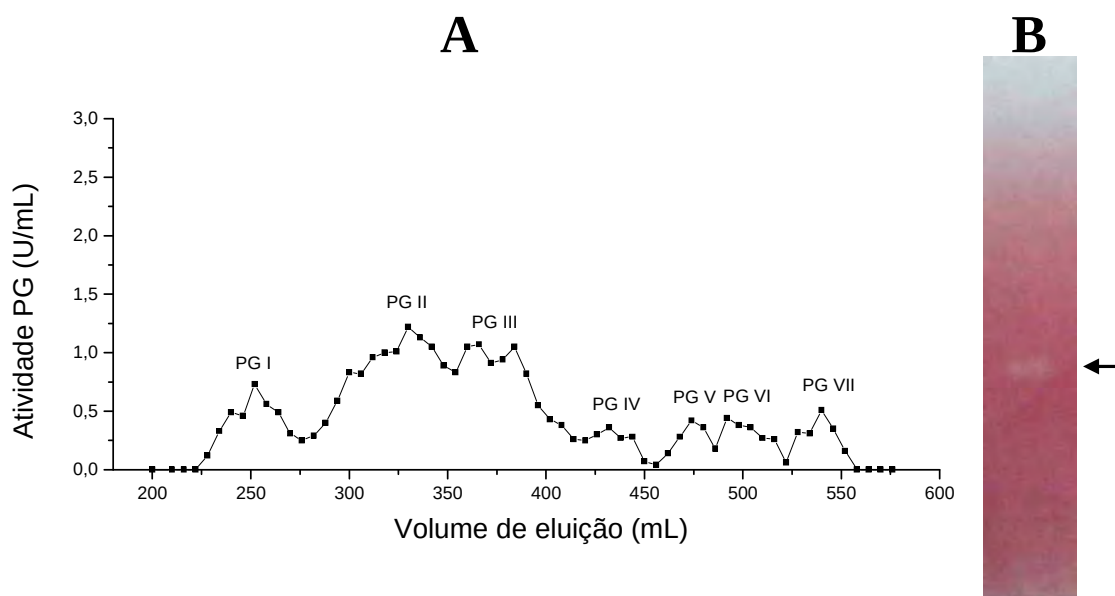


Figura 16: (A) Perfil de eluição de PGs produzidas por *A. niger* em coluna de filtração em gel Sephadex G-100. (B) Zimograma em PAGE.

Não se observaram grandes ganhos nos valores de atividade específica em relação à solução enzimática bruta. Nas frações eluídas II e III houve os maiores aumentos de atividade específica (Tabela 03).

Tabela 03: Fracionamento de PGs produzidas por *A.niger* em coluna Sephadex G-100 a partir da solução enzimática bruta obtida obtido em 11 dias de fermentação.

	Atividade (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Solução enzimática bruta	3,4	1,90	1,78
Concentrado	32,1	18,60	1,72
Pico da fração eluída I (240-264 mL)	0,40	0,10	4,00
Pico da fração eluída II (318-342 mL)	0,9	0,15	6,00
Pico da fração eluída II (360-384 mL)	0,7	0,30	2,33
Pico da fração eluída IV (426-444 mL)	0,3	0,28	1,07

* As frações eluídas V, VI e VII não constam na tabela devido à baixa recuperação de suas atividades enzimáticas.

A solução enzimática bruta obtida pelo cultivo de *Penicillium italicum*, por 4 dias, em farelo de trigo, foi processada conforme o descrito para enzima de *A. niger*. Foram aplicadas 194,6 U de enzima (3,8 mL) na coluna. Foi detectada atividade em 207 mL a 447 mL de volume de eluição. Foram obtidos 3 picos de atividade enzimática, indicando a presença de no mínimo 3 PGs distintas (Figura 17A). No zimograma (Figura 17B), foram observadas três bandas, corroborando o resultado obtido na filtração em gel.

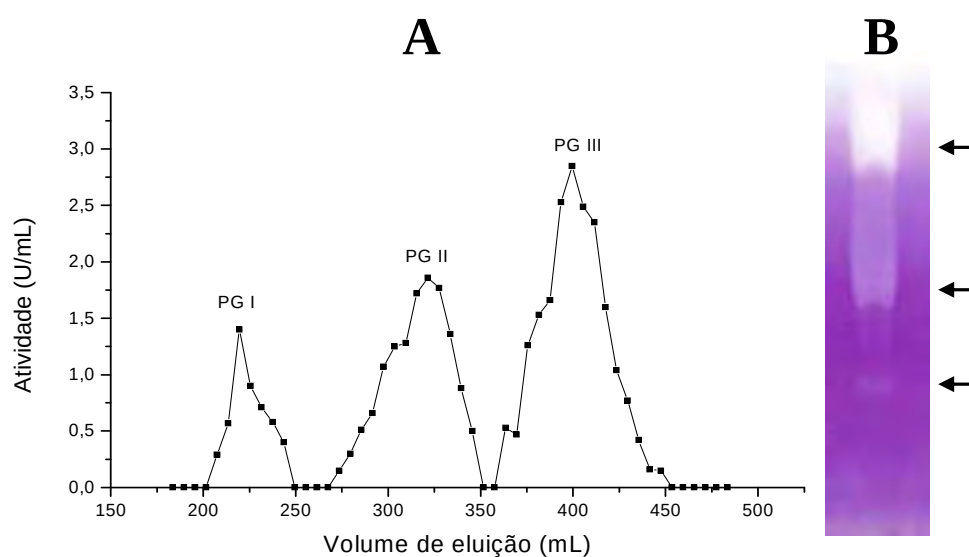


Figura 17: (A) Perfil de eluição de PGs produzidas por *P. italicum* em coluna de filtração em gel Sephadex -100. (B) Zimograma em PAGE.

Em todas as frações eluídas, houve aumento de atividade específica em relação à solução enzimática bruta, especialmente na fração I (70,0 U/mg) (Tabela 04).

Tabela 04: Fracionamento de PGs produzidas por *P. italicum* em coluna Sephadex G-100 a partir da solução enzimática bruta obtida em 4 dias de fermentação

	Atividade (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Solução enzimática bruta	3,2	1,12	2,86
Concentrado	51,2	21,00	2,44
Pico da fração eluída I (216-231 mL)	0,7	0,01	70,00
Pico da fração eluída II (309-333 mL)	1,0	0,05	20,00
Pico da fração eluída III (387-417 mL)	1,3	0,12	10,83

Foram aplicados 180,5 U (2,5 mL) de PG produzida em 12 dias de cultivo por *A. fumigatus*, sendo detectada atividade de 188 mL a 290 mL de eluição. Apenas um pico de atividade foi obtido. Entretanto, considerando-se a base larga e o perfil do pico, pode-se deduzir que o método usado não permite a separação das isoformas (Figura 18A). No zimograma, porém, observou-se uma grande faixa de degradação, não sendo possível distinguir bandas, porém pode-se considerar a presença de no mínimo duas PGs, uma de maior massa molar na zona clara mais abaulada do zimograma, e outra de menor massa molecular na extremidade da zona de degradação (Figura 18B), assim, a obtenção de um só pico não permite concluir que apenas uma PG está presente neste pico. Este resultado é bem diferente do que se observou em *A.niger* para o qual vários picos ficaram bem evidentes (Figura 16A); apesar destas duas espécies pertencerem ao mesmo gênero apresentaram perfis de eluição totalmente distintos. Considerando que este fungo é termodúrico, é possível uma correlação entre temperatura de crescimento e expressão de formas de PG.

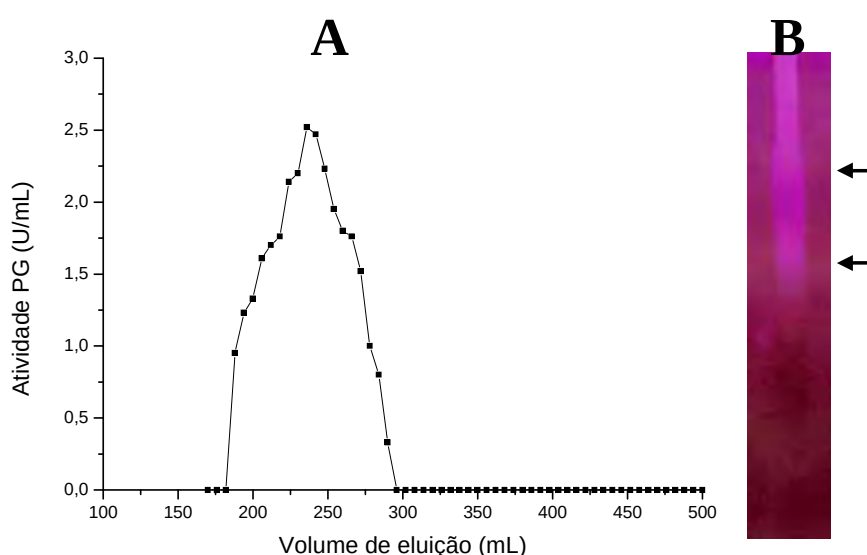


Figura 18: (A) Perfil de eluição de PGs produzidas por *A. fumigatus* em coluna de filtração em gel Sephadex G-100. (B) Zimograma em PAGE.

A Tabela 05 mostra que houve grande redução no valor de proteínas totais no pico de eluição, em relação a enzima bruta. A atividade específica do pico (52,5 U/mg) foi aproximadamente 9 vezes maior que da solução enzimática bruta (5,9 U/mg).

Tabela 05: Fracionamento de PGs produzidas por *A. fumigatus* em coluna Sephadex G-100 a partir da solução enzimática bruta obtida em 12 dias de fermentação

	Atividade (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Solução enzimática bruta	6,6	1,12	5,9
Concentrado	72,2	14,16	5,10
Pico da fração eluída (233-242 mL)	2,1	0,04	52,5

Na cromatografia realizada com o preparado enzimático de *Rhizomucor pusillus* foram aplicados 135,0 U de PG (2,6 mL) produzida em 6 dias de fermentação. Detectou-se atividade enzimática entre 318 mL e 414 mL de eluição (Figura 19A).

A Figura 19A mostra um único pico, porém este não apresenta um ápice definido. O zimograma (Figura 19B) revelou claramente 3 bandas obtidas a partir da solução enzimática bruta deste fungo. Assim, o que parece ser um pico é, de fato, a sobreposição de três picos que, em decorrência da limitação de resolução da coluna usada, não foram separados.

Dentre todos os fungos empregados no presente trabalho, *R. pusillus* foi o que apresentou a solução enzimática bruta com o menor teor de proteínas totais (0,60 mg/mL). O pico de eluição apresentou aumento na atividade específica de aproximadamente 6 vezes e redução de 90% no valor de proteínas totais em relação à amostra enzimática bruta (Tabela 06).

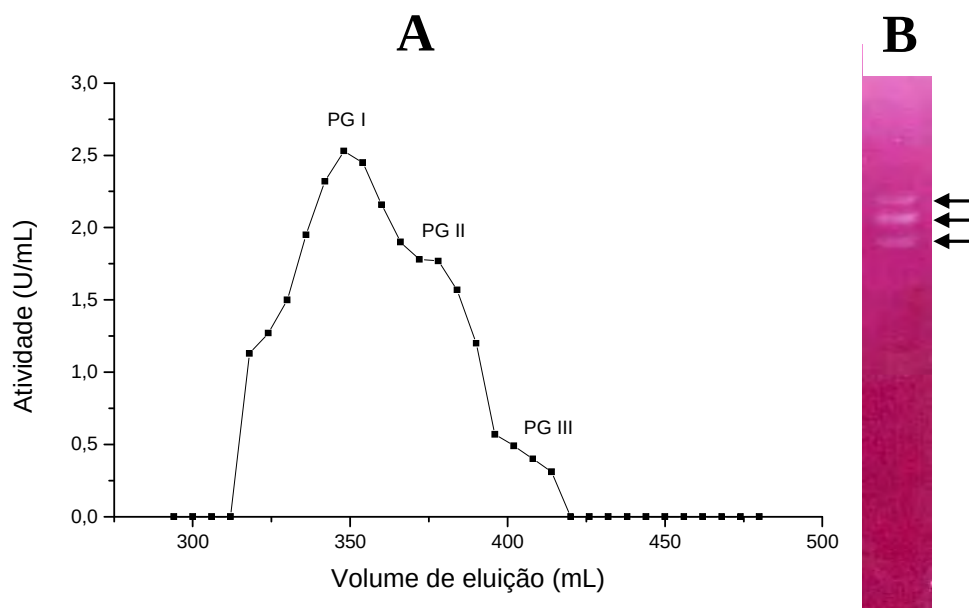


Figura 19: (A) Perfil de eluição de PGs produzidas por *R. pusillus* em coluna de filtração em gel Sephadex G-100. (B) Zimograma em PAGE.

Tabela 06: Fracionamento de PGs produzidas por *R. pusillus* em coluna Sephadex G-100 a partir da solução enzimática bruta obtida em 6 dias de fermentação

	Atividade (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Solução enzimática bruta	2,3	0,60	3,83
Concentrado	45	17,90	2,51
Pico da fração eluída (342-354 mL)	1,3	0,06	22,16

Na análise cromatográfica de PGs produzidas por *Thermomyces lanuginosus* foram aplicadas 94,5 U de enzima em 4,5 mL. Foi possível detectar atividade enzimática entre 276 ml e 366 mL de eluição e três picos de atividade bem distintos (Figura 20A). Este resultado está de acordo com o observado no zimograma (Figura 20B), que também revelou três frações para este fungo.

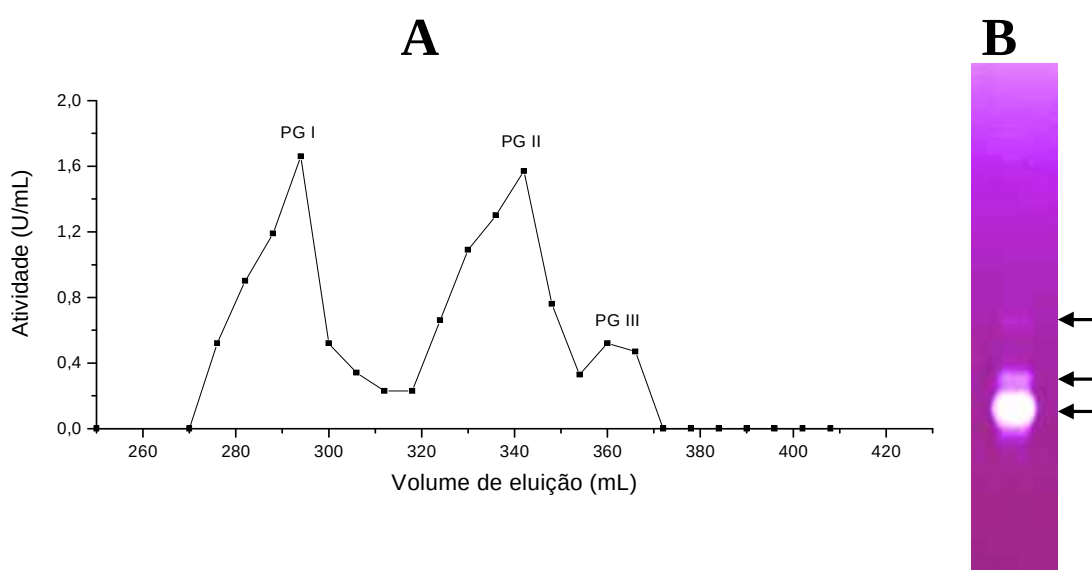


Figura 20: (A) Perfil de eluição de PGs produzidas por *T. lanuginosus* em coluna de filtração em gel Sephadex G-100. (B) Zimograma em PAGE.

O pico da primeira fração eluída apresentou atividade específica superior àquela apresentada pela amostra enzimática bruta, o pico da segunda fração eluída, porém, apresentou atividade específica menor (Tabela 07).

Tabela 07: Fracionamento de PGs produzidas por *T. lanuginosus* em coluna Sephadex G-100 a partir da solução enzimática bruta obtida em 2 dias de fermentação

	Atividade (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Solução enzimática bruta	2,8	3,60	0,78
Concentrado	21	14,72	1,42
Pico da fração eluída 1 (282-294 mL)	0,3	0,04	7,5
Pico da fração eluída 2 (324-354 mL)	0,2	0,36	0,55

* A fração eluída III não consta na tabela devido à baixa recuperação de sua atividade enzimática.

5.5 Caracterização físico-química das PGs dos fungos termofílicos obtidas por filtração em gel

Frações de PGs, obtidas nas cromatografias em gel Sephadex G-100, foram caracterizadas para aferir se houve alterações em suas características em relação às observadas nas soluções enzimáticas brutas.

5.5.1 Efeitos do pH e temperatura sobre a atividade das PGs e termoestabilidade das PGs

A Figura 21 mostra que a PG do pico de atividade obtido na cromatografia de *Aspergillus fumigatus* (233 mL a 242 mL de eluição) apresentou o mesmo perfil de atividade frente a variações de pH que o observado para a enzima da solução enzimática bruta (Figura 07), com pH ótimo 5,5.

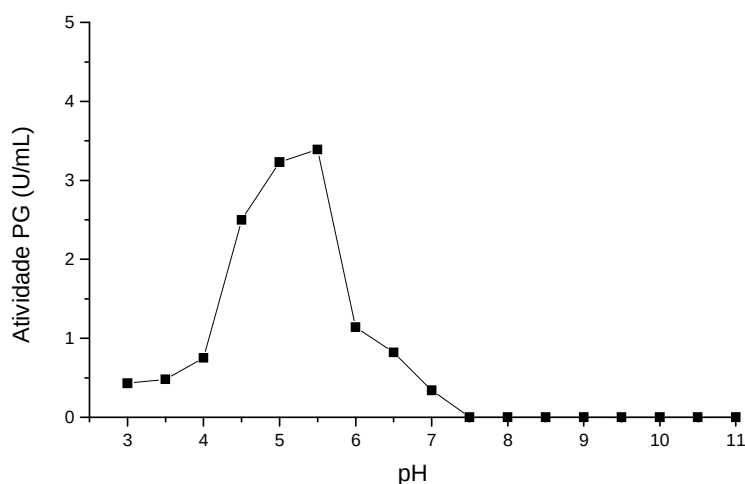


Figura 21: Efeito do pH sobre a atividade de PG do fungo *A. fumigatus* obtida por filtração em gel SEPHADEX G-100. Tampões utilizados: acetato de sódio 3,5 – 5,5, Mcllvaine 6,0 – 7,5, glicina 8,0 – 11.

Com relação à influência da temperatura sobre a atividade da enzima, nota-se um pico de atividade bem definido a 60°C (Figura 22). Este resultado é diferente do que foi observado na solução enzimática bruta, em que o pico de atividade ficou estabelecido na faixa de 50°C a 60°C, com temperatura ótima de 55°C (Figura 12).

A enzima foi estável a 50°C, perdendo atividade acentuadamente em temperaturas superiores, semelhantemente ao observado na solução enzimática bruta.

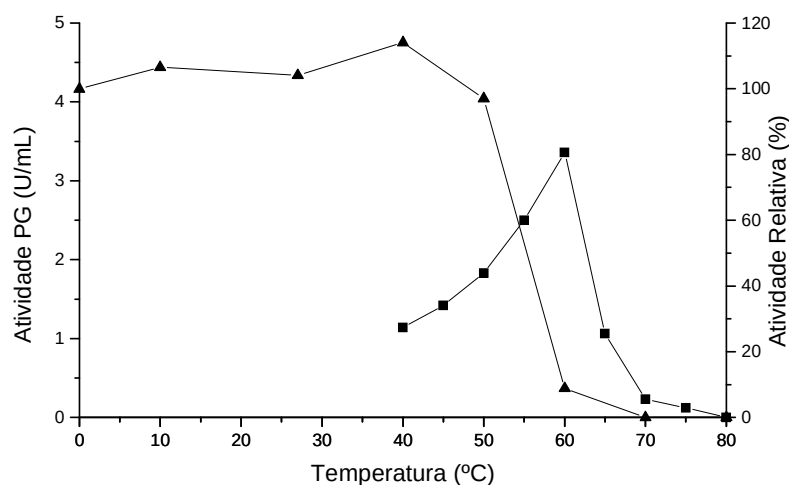


Figura 22: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG do fungo *A. fumigatus* obtida por filtração em gel Sephadex G-100.
 — ■ — atividade de PG nas condições de reação descritas — ▲ — estabilidade de PG após 1 h nas temperaturas indicadas, em ausência de substrato.

A caracterização da PG obtida no pico de atividade da cromatografia de *Rhizomucor pusillus* (342 mL a 354 mL de eluição) revelou atividade enzimática na faixa de pH 4,0-6,5 com maior atividade em pH 5,0 (Figura 23). Na solução enzimática bruta se observou atividade em uma faixa de pH mais ampla (pH3,0-6,5) (Figura 08).

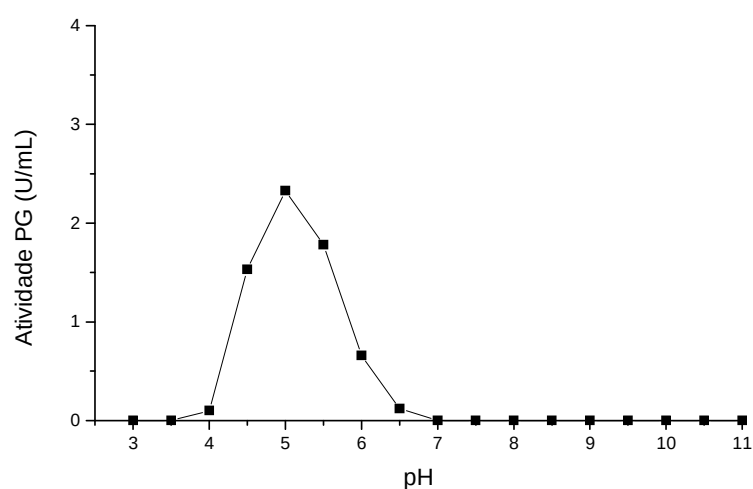


Figura 23: Efeito do pH sobre a atividade de PG do fungo *R. pusillus* obtida por filtração em gel Sephadex G-100. Tampões utilizados: acetato de sódio 3,5 – 5,5, McIlvaine 6,0 – 7,5, glicina 8,0 – 11.

Diante da variação de temperatura, a enzima eluída de *R. pusillus* teve pico de atividade em 60°C (Figura 24). Na solução enzimática bruta o pico de atividade não foi bem definido, estendendo-se pela faixa de 50°C a 60°C (Figura 13).

A enzima eluída manteve 92% da atividade original a 50°C, sendo plenamente estável na zona de 27°C a 40°C (Figura 24). Nota-se que a estabilidade aumentou após o processo de filtração em gel, pois, na forma bruta, a enzima foi estável até 40°C (Figura 13), com perda acentuada de atividade em temperaturas superiores. É possível que fatores responsáveis pelo decaimento de atividade enzimática, como proteases, presentes na solução enzimática bruta, tenham sido excluídos na cromatografia.

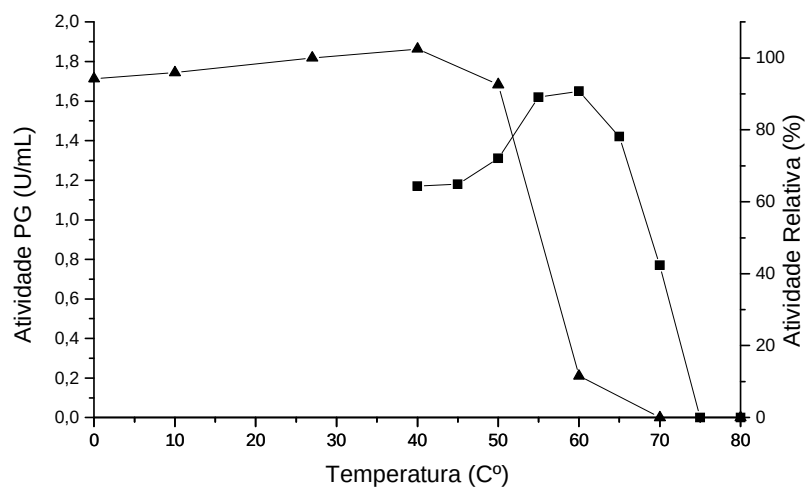


Figura 24: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de PG do fungo *R. pusillus* obtida por filtração em gel Sephadex G-100.

— ■ — atividade de PG nas condições de reação descritas —▲— estabilidade de PG após 1 h nas temperaturas indicadas, em ausência de substrato.

A PG I produzida pelo fungo *Thermomyces lanuginosus* obtida na cromatografia (282ml a 294mL de eluição) apresentou atividade na faixa de pH 4,5-6,0, com atividade máxima em pH 5,0-5,5 (Figura 25). Na solução enzimática bruta, a ação associada das diferentes PGs proporcionou dois picos, o maior deles se deu em pH 5,0 (Figura 09).

Quanto ao efeito da temperatura (Figura 26), foi observado o mesmo perfil mostrado pela solução enzimática bruta (Figura 14). A enzima foi plenamente estável a 40°C e manteve 89% da atividade original a 50°C. A temperatura ótima para a atividade enzimática foi de 70°C.

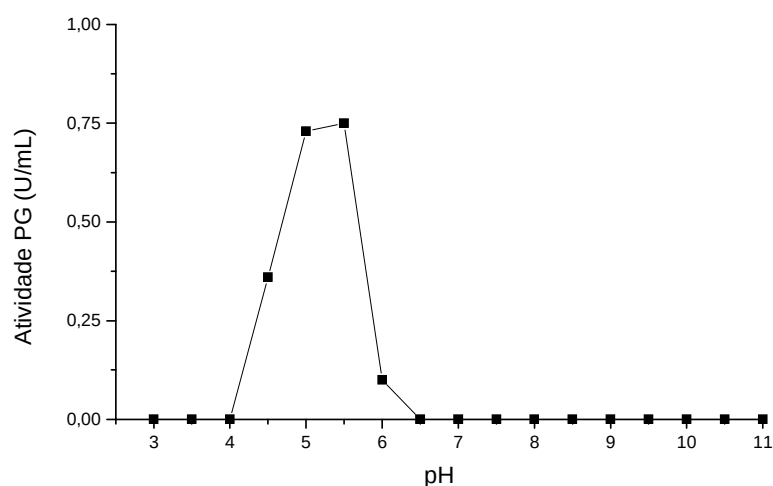


Figura 25: Efeito do pH sobre a atividade da 1ª fração de PG do fungo *T. lanuginosus* obtida por filtração em gel Sephadex G-100. Tampões utilizados: acetato de sódio 3,5 – 5,5, McIlvaine 6,0 – 7,5, glicina 8,0 – 11.

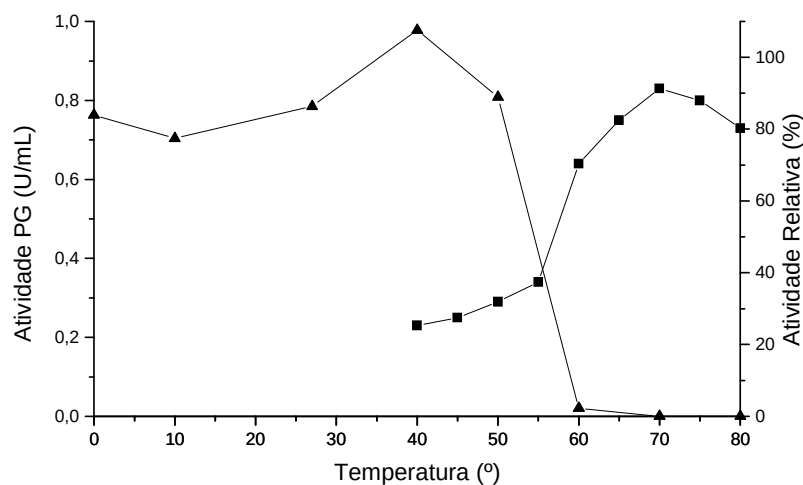


Figura 26: Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da 1ª fração de PG do fungo *T. lanuginosus* obtida por filtração em gel Sephadex G-100.
 — ■ — atividade de PG nas condições de reação descritas —▲— estabilidade de PG após 1 h nas temperaturas indicadas, em ausência de substrato.

5.6 Determinação da especificidade pelo substrato das PGs dos fungos termofílicos

As enzimas brutas e eluídas dos fungos termofílicos foram incubadas em pectinas de citrus com diferentes graus de esterificação, e pectina de maçã. As reações foram feitas em temperatura e pH ótimo para cada amostra enzimática.

Para *A. fumigatus*, observou-se que tanto a amostra enzimática bruta quanto a eluída, obtida na cromatografia (233 mL a 242 mL de eluição – Figura 18A), apresentaram alta atividade sobre a pectina com esterificação de 64%-72%. As atividades enzimáticas detectadas para os demais tipos de pectina foram muito baixas, não sendo observada atividade da enzima eluída sobre pectinas de citrus de alta e baixa esterificação (Figura 27).

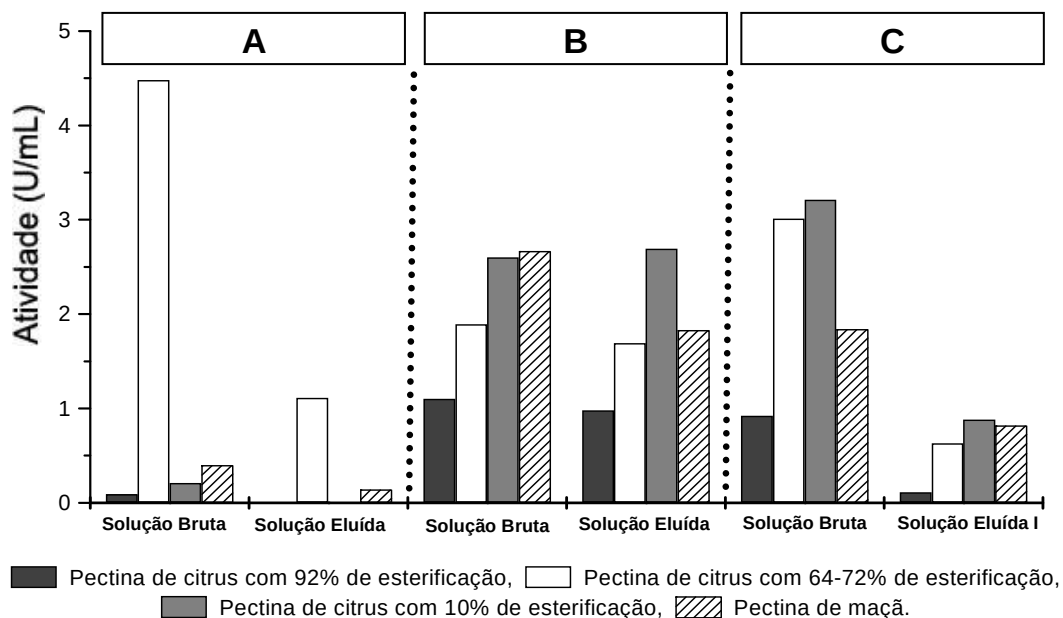


Figura 27: Especificidade ao substrato das PGs brutas e eluídas. **A:** *A. fumigatus*, **B:** *R. pusillus*, **C:** *T. lanuginosus*

As PGs de *R. pusillus* apresentaram maior atividade quando o substrato foi pectina de baixa esterificação, com gradativa diminuição da atividade frente ao aumento do grau de esterificação. A amostra bruta e a eluída obtida na cromatografia (342 mL a 354 mL de eluição – Figura 19A) apresentaram o mesmo padrão de atividade sobre as diferentes pectinas de citrus (Figura 27).

As PGs bruta e eluída obtida na cromatografia (282mL a 294mL de eluição – Figura 20B) de *T. lanuginosus*, semelhantemente ao observado em *R. pusillus*, tiveram maior afinidade pela pectina de baixa esterificação (Figura 27). Este resultado é semelhante ao obtido por Sathish-Kumar e Palanivelu (1999) para uma PG purificada de *T. lanuginosus*. No referido trabalho, a PG apresentou, em pectina, apenas 33% da atividade observada em pectato, que é um substrato com baixíssima esterificação. Muitas PGs têm ação preferencial pela pectina de baixa esterificação (MARTINS, 2006).

5.7 Produção de PG em FES por *A. fumigatus* em diferentes substratos

Os cultivos de *A. fumigatus* produziram PGs mais termoestáveis, e suas soluções enzimáticas brutas apresentaram maiores atividades de PG (U/g). Por estas razões esta espécie foi selecionada para a realização de novos cultivos em misturas de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar lavado, em farelo de algodão e em bagaço de laranja lavado.

A Figura 28 mostra que a maior produtividade foi observada no cultivo em mistura com 80% de farelo de trigo e 20% de bagaço de cana. Neste caso, a atividade de PG cresceu linearmente até o 4º dia de cultivo (35 U/g). Do 4º ao 10º dia a atividade estacionou na faixa de 35 a 40 U/g.

As FES em farelo de algodão e em mistura com 50% de farelo de trigo e 50% de bagaço de cana apresentaram perfis semelhantes de produção de PG, com picos de atividade média de PG de 22 U/g e 26 U/g, respectivamente. O bagaço de laranja foi o meio para o qual se observou menor produtividade, com atividade máxima de PG de 16 U/g alcançada no 7º dia de fermentação.

Uma comparação entre as Figuras 04 e 27 permite concluir que, dentre todos os meios de cultivo testados, o que proporcionou maior produção de PG por *A. fumigatus* em FES foi aquele usado inicialmente, em que o farelo de trigo foi a única fonte de carbono.

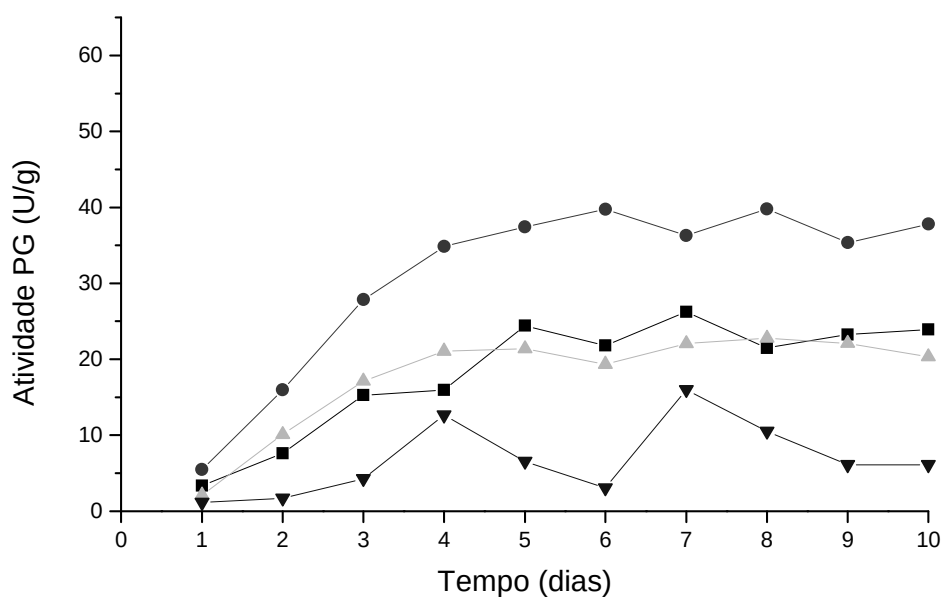


Figura 28: Produção de PG pelo fungo *A. fumigatus* em diferentes substratos: —■— 50% de farelo de trigo e 50% de bagaço de cana lavado, —●— 80% de farelo de trigo e 20% de bagaço de cana lavado, —▲— farelo de algodão, —▼— bagaço de laranja lavado.

6. CONCLUSÕES

O farelo de trigo foi um bom substrato para a produção de PGs para todos os fungos. *A. fumigatus* foi capaz de produzir boas quantidades de PG em misturas de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar lavado e em farelo de algodão, porém o farelo de trigo foi o melhor meio para produção de PGs por esta espécie.

As PGs dos fungos termofílicos apresentaram maiores valores de temperatura ótima que as PGs dos mesofílicos. *T. laniginosus* produziu a PG com maior temperatura ótima (70°C). *A. fumigatus* produziu a PG mais termoestável, mantendo 100% da atividade original após 1 h de incubação a 50°C em ausência de substrato, com temperatura ótima de 50-60°C para a solução enzimática bruta, sendo estável na faixa de pH 4,0-11 e com temperatura ótima de 60°C para a fração obtida no pico de atividade da filtração em gel.

As soluções enzimáticas brutas de todos os fungos apresentaram maiores valores de atividade de Endo-PGs do que de Exo-PGs. As PGs dos fungos termofílicos apresentaram maior especificidade para pectinas de baixa esterificação. A PG de *A. fumigatus* apresentou grande especificidade para pectina com esterificação de 64-72%.

Os zimogramas que apresentaram melhor resolução foram aqueles realizados para *P. italicum* e para os termofílicos (*T. lanuginosus* e *R. pusillus*).

Os fungos termofílicos produziram poucas isoformas de PG (no máximo 3 isozimas). A PG produzida por *A. fumigatus* apresentou maior afinidade por pectina com 64-72% de esterificação. As PGs de *R. pusillus* e de *T. lanuginosus* apresentaram maior afinidade por pectinas de baixa esterificação.

7. LITERATURA CITADA

ABE, K.; ITO, Y.; OHMACHI, T. ASSADA, Y. Purification and Properties of two isozymes of gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* TAM-4. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 61, p. 1621-1625, 1997.

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

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

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

ALBERSHEIM, P.; NEUKON, H.; DEUEL, H. Splitting of pectin chain molecules in neutral solution. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 90, p. 46-51, 1960.

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

BALALI, G.; KOWSARI, M. Pectic zymogram variation and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-4 to bean (*Phaseolus vulgaris*) isolates in Isfahn, Iran. **Mycopathologia**, v. 158, 2004 , pp. 377-383.

BARFOD, N. M.; PEDERSEN, K. S. Determining the setting point temperature of high-methoxyl pectin gels. **Food Thecnology**, v. 44, p. 139-148, 1990

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

BASTOS, M. S. R.; GURGEL, T. E. P.; SOUSA FILHO, M. S. M. Efeito da aplicação de enzimas pectinolíticas no rendimento da extração de polpa de cupuaçu. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, p. 240-242, 2002.

BLANCO, P.; SIEIRO, C.; DÍAZ, S.; REBOREDO, N. M.; VILLA, T. G. Grape juice biodegradation by poligalacturonases from *Saccharomyces cerevisiae*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 40, p. 115-118, 1997.

BOCCAS, F.; ROUSSOS, G.; GUTIERREZ, M.; SERRANO, L.; VINIEGRA, G. G. Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. **Journal of Food and Science Technology**, v. 31, p. 22-26, 1994.

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

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

BUSSINK, H. J.; BUXTON, F. P.; FRAAYE, B. A.; DE GRAAFF, L. H.; VISSER, J. The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. **European Journal of Biochemistry**, v. 208, p. 83-90, 1992.

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

CAMPERI, A. S.; GRASSELLI, M.; CASCONI, O. Fungal pectic enzyme fractionation by dye affinity chromatography. **Biotechnology Techniques**, v. 10, p. 211-214, 1996.

CAPRARI, C.; BERGMANN, C.; MIGHELI, Q.; SALVI, G.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A.; CERVONE, F.; DE LORENZO, G. *Fusarium moniliforme* secretes four endopolygalacturonases derived from a single gene product. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 43, p. 453-462, 1993.

CARROLL, S. B.; GRENIER, J. K.; WEATHERBEE, S. D. **From DNA to diversity: Molecular genetics and the evolution of animal design**, 2nd ed. Malden: Blackwell Scientific, 2005.

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

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

CERDA, J. J. The role of grapefruit in health and disease. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 9, p. 203-13, 1987.

CHESSON, A. Maceration in relation to the post handling and processing of plant material. **Journal of Apllied Biotechnology**, v. 48, p. 1-45, 1980.

CODNER, R.C. Pectinolytic and cellulolytic enzymes in the microbial modification of plant tissues. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 34, n.1 , p. 147-160, 1971.

COLLMER, A.; RIED, J. L.; MOUNT, M. S. Assay methods for pectic enzymes. **Methods in Enzymology**, v. 161, p. 329-335, 1998.

COUTINHO, P. M; STAM, M; BLANC, E.; HENRISSAT, B. Why are there so many carbohydrate-active enzyme-related genes in plants? **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 563-565, 2003.

CRITTENDEN, R. G.; PLAINE, M. J. Production, properties and application of food-grade oligossacarides. **Trends Food Science Technology**, v. 7, p. 353-361, 1996.

CRUICKSHANK, R. H.; WADE, G. C. Detection of pectic enzymes in pectin-acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 107, p. 177–181, 1980.

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

DE VRIES, R. P. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 61, p. 10-20, 2003.

DE LORENZO, G.; D'OVIDIO, R.; CERVONE, F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPS) in defense against pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 313-335, 2001.

DE LORENZO, G.; FERRARI, S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 295-299, 2002.

DE VRIES, R. P.; VISSER, J. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 65, p. 497-522, 2001.

DEBING, J.; PEIJUN, L.; STAGNITTI, F.; XIANZHE, X.; LI, L. Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 244-250, 2006.

DEVI, N. A.; RAO, A. G. A. Fractionation, purification, and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 59-65, 1996.

DI LENNA, P.; FIELDING, A. H.: Multiple forms of polygalacturonase in apple and carrot tissue infected by isolates of *Botrytis cinerea*. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 3015–3018, 1983

DI MATTEO, A.; BONIVENTO, D.; TSERNOGLOU, D.; FREDERICI, L.; CERVONE, F. Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in plant defence: a structural view. **Phytochemistry**, v. 67, p. 528-533, 2006.

D'OVIDIO R, MATTEI B, ROBERTI S, BELLINCAMPI D. Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p. 237-244, 2004.

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

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; OLIVARES, J.; BEDMAR, E. J. Two differentially regulated nitrate reductases required for nitrate-dependent microaerobic growth of *Bradyrhizobium japonicum*. **Archives of Microbiology**, v. 162, p. 310–315. 1994.

FONSECA, M. J. V.; SAID, S. The pectinase produced by *Tubercularia vulgaris* in submerged culture using pectin or orange-pulp pellets as inducer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 32-35, 1994.

FODA, M. S.; RIZK, I. R. S.; GIBRIEL, A. Y.; BASHA, S. I.; Biochemical properties of polygalacturonase, produced by *Aspergillus aculeatus* and *Mucor pusillus*. **Zentralblatt fuer Mikrobiologie**, v. 139, p. 463-469, 1984.

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

FREDERICI, L.; DI MATTEO, A.; FERNANDEZ-RECIO, J.; TSERNOGLOU, D.; CERVONE, F. Polygalacturonase inhibiting proteins: players in plant innate immunity? **Trends in Plant Science**, v. 11, nº2, p. 65-70, 2006.

FREITAS, P. M.; MARTIN, N.; SILVA, D.; SILVA, R.; GOMES, E. Production and partial characterization of polygalaturonases produced by thermophilic *Monascus* sp N8 and by thermotolerant *Aspergillus* sp n12 on solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 302-306, 2006.

FRY, S. C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review Plant Physiology**, v. 37, p. 165-186, 1986.

GANTOTTI, B. V.; AND DAVIS, M.J.. Pectic zymogram analysis for characterizing genetic diversity of the mango anthracnose pathogen. **Acta Horticulturae**, v. 341, p. 353-359, 1993.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA TORRES, E.; AGUILAR, C. N.; RÓMERO-GOMEZ, S, J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3643, p. 1-11, 2002.

GRANELLA, V.; DAUDT, C. E.; PENNA, N. G.; FOGAÇA, A. O. A influência de enzimas pectinolíticas e cultivares de videira, na formação de álcoois superiores (óleo fusel), durante a fermentação de mostos. **Higiene Alimentar**, v. 19, p. 33-39, 2005.

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

GUO, Y.; MATSUMOTO, T.; KIKUCHI, Y.; IKEJIMA, T.; WANG, B.; YAMADA, H. Effects of a pectic polysaccharide from a medicinal herb, the roots of *Bupleurum falcatum* L. on interleukin 6 production of murine B cells and B cell lines. **International Immunopharmacology**, v. 49, p. 307-316, 2000.

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

HANG, Y. D.; WOODAMS, E. E. Production of fungal polygalacturonase from apple pomace. **Food and Science Technology**, v. 27, p. 194-196, 1994.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48, n.2, p.422-427, 1972.

HENRICSSON, G.; AKIN, D. E.; SOLMEZYNSKI, D.; ERICSON, K. E. L. Production of highly efficient enzymes for flax retting by *Rhizomucor pusillus*. **Journal of Biotechnology**, v. 68, p. 115-123, 1999.

HERRON, S R; BENEN, J A; SCAVETTA, R D; VISSER, J; JURNAK, F. Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America**, v. 97, p. 8762-8769, 2000.

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

HICKS, D. B. Purification of three catalase isozymes from facultatively alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1229, p. 347-355, 1995.

HOEFFER, A. C. Other pectin food products. In: R.H. Walter (ed.). **The Chemistry and Technology of Pectin**. California: Academic Press, p. 51-66, 1991.

HUBER, D. J. The role of cell wall hydrolases in fruit softening. **Horticultural reviews**, v. 5, p. 169-219, 1983.

HUGHES, A. L.; FRIEDMAN, R. Parallel Evolution by Gene Duplication in the Genomes of Two Unicellular Fungi. **Genome Research**, v. 13, p. 794-799, 2003.

ISSHIKI, A.; AKIMITSU, K.; ISHII, H.; YAMAMOTO, H. Purification of polygalacturonases produced by the pear scab pathogens, *Venturia nashicola* and *Venturia pirina*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 56, p. 263-271, 2000.

IWASAKI, K. I.; INOUE, M.; MATSUBARA, Y. Continuous hydrolysis of pectate by immobilized endo-polygalacturonase in a continuously stirred tank reactor. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p. 262-267, 1998.

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

JOHNSTON, D. J.; WILLIAMSON, B. Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, v. 96, p. 343–349, 1992.

JOUANY, J. P.; MATHIEU, F.; SENAUD, J. BOHATIER, J.; BERTIN, G.; MERCIER, M. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on the digestion of the cell wall fraction of a mixed diet in a defaunated and refaunated sheep rumen. **Reproduction Nutrition Development**, v. 38, p. 401-416, 1998.

JUGE, N. Plant Protein Inhibitors of Cell Wall Degrading Enzymes. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 359-367, 2006.

KAPOOR, M.; BEG, Q. K.; BLUSHAN, B.; SINGH, K.; DADHICH, K. S.; HOONDAL, G. S. Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibres. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 803-807, 2001.

KARAN, N. E.; BELARBI, A. Detections of polygalacturonases and pectin esterases in lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 559-563, 1995.

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

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

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

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

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

LANG, C.; DORNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 366-375, 2000.

LEE, T. H.; KIM, B. Y.; CHUNG, Y. R.; LEE, S. Y.; LEE, C. W.; KIM, J. W.; Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Botrytis cinerea*. **Journal of Microbiology**, v. 35, p. 134-140, 1997.

LEA, A. G. H. **Enzymes in the production of beverages and fruit juices**. In: Tucker, G. A. and Woods, L. F. J. Enzymes in Food Processing, sec. Ed, Backie Academic & Professional, Glasgow, p. 223-247, 1998.

LONSANE, B. K.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; GHILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, M.; KRISHNAIAH, M. M. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 259-273, 1992.

MARGO, P.; VARVARO, L.; CHILOSI, G.; AVANZO, C.; BALESTRA, G. M. Pectinolytic enzymes produced by *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 117, p. 1-6, 1994.

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

MAGRO, P.; DI LENNA, P.; MARCIANO, P.; PALLAVICINI, C. Variability of polygalacturonase and protein isoelectric focusing patterns in *Botrytis cinerea* isolates. **Journal of General Microbiology**, v. 120, p. 105–109, 1980.

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. **Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases termoestáveis: Produção, caracterização e purificação parcial da poligalacturonase**. 2006. 65 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

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

MARTINS, E. S. **Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através fermentação submersa e fermentação em estado sólido**. 2006. 108 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 949-954, 2002.

MC NEILL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHELM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review Biochemistry**, v. 53, p. 625-663, 1984.

McMILLAN, G. P., JHONSTON, D. J.; PEROMBELON, M. C. M. Purification to homogeneity of extracellular polygalacturonase and isoenzymes of pectate lyase of *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* by column chromatography. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p. 83-86, 1992.

MERT-TÜRK, F. Phytoalexins: defense or just a response to stress. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 1, p. 1-6, 2002.

MILLER, G. H. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, 31: 426-428.

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

MITCHELL, C. G.; ANDERSON, S.; EL-MANSI, E. M. T. Purification and characterization of citrate synthase isozymes from *Pseudomonas aeruginosa*. **The Biochemical Journal**, v. 309, p. 507-511, 1995

MOLINA, S. M. G.; PELISSARI, F. A.; VITORELLO, C. B. M. Screening and genetic improvement of pectinolytic fungi for degumming of textile fibers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 320-326, 2001.

MOSS, G. P. **Nomenclature of multiple forms of enzymes**. In: Liébecq C. ed. Biochemical Nomenclature and Related Documents, 2nd edn. Seattle: Portland Press, 1992.

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

NAGAO, T.; MITAMURA, T.; WANG, X. H.; NEGORO, S.; YOMO, T.; URABE, I.; OKADA, H. Cloning, nucleotide sequences, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 5013-5020, 1992.

NIGHOJKAR, A. ; SRIVASTAVA, S.; KUMAR, A. Production of low methoxil pectin using immobilized pectinesterase bioreactors. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 346-349, 1995.

NELSON, N. A fotometric adaptaion of Somogyimethod for the determination of glucose. **Journal of Biology Chemistry**, v. 153, p. 375-80, 1944.

OESER, B.; HEIDRICH, P. M.; MULLER, U.; TUDZYNSKI, P.; TENBERGE, K. B. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. **Fungal Genetics and Biology**, v. 36, p. 176–186, 2002.

O'NEILL, M. A.; YORK W. S. **The composition and structure of plant primary cell walls**. In JKC Rose, ed, *The Plant Cell Wall*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, p. 1–54, 2003.

PALMA-FERNANDES, E. R.; GOMES, E.; SILVA, R. Purification and characterization of two β -glicosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Folia Microbiology**, v. 47, p. 685-690, 2002.

PANDA, T.; NAIR, S. R.; KUMAR, M. P. Regulation of synthesis of the pectolytic enzymes of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 466-473, 2004.

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

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

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

PARENICOVA, L.; BENEN, J. A.; KESTER, H. C.; VISSER, J. pgaE encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. **European Journal of Biochemistry**, v. 251, p. 72-80, 1998.

PAXTON, J. D. Phytoalexins a working redefinition. **Journal of Phytopathology**, v. 132, p.1-45, 1980.

PERÉZ, S.; MAZEAU, K.; HERVE DU PENHOAT, C. The three dimensional structures of the pectic polysaccharides. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 38, p. 37-55, 2000.

PERICIN, D.; KEVRESAN, S.; BANKA, L.; ANTOV, M.; SKRINJAR, M. Separation of the components of pectinolytic complex produced by *Polyporus squamosus* In Submerged Culture. **Biotechnology Letters**, v. 14, nº 2, p 127-131, 1992.

PILGRIM, G. W.; WALTER, R. H.; OAKENFUL, D. G. 1991. Jams, jellies and preserves. In: R.H. Walter (ed.). **The Chemistry and Technology of Pectin**. California: Academic Press. p. 23-50, 1991.

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

PUCHART, V.; KATAPODIS, P.; BIELY, P.; KREMnický, L.; CHRISTAKOPOULOS, P.; VRRSANSKÁ, M.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; BHAT, M. K. Production of xylanases, mannanases and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 355-361, 1999.

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

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-967, 2001.

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

SAID, S., FONSECA, M.J.V., SIÉSSERE, V. Pectinase production by *Penicillium frequentans*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 7, p. 607-608, 1991.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advances Applied Microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993

SATISH-KUMAR, S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular polygalacturonase from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 15, p. 643-646, 1999.

SATO, M.; KAJI, A. Action pattern of Pectate lyase from *Streptomyces nitrosporeus*. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 41, p. 2199-2203, 1977.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger*: a review. **Applied microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426-435, 2002.

SCHWAN, R. F.; COOPER, R. M.; WHEALS, A. E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 234-244, 1997.

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

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

SHARMA, H. S. S.; ROBINSON, E. Fungal colonization during glyphosate induced desiccation and dew-retting of flax cultivars. **Technical Report**, v. 2281, p. 11, 1983.

SHAW, C. R. Isozymes: Classification, frequency and significance, **International Review of Cytology**, v. 25, p. 297-332, 1969.

SHIEH, M.; BROWN, R.L.; WHITEHEAD, M.P.; CAREY, J.W.; COTTY, P.J.; CLEVELAND, T.E.; DEAN, R.A. Molecular genetic evidence for the involvement of a specific polygalacturonase P2c in the invasion and spread of *Aspergillus avus* in cotton bolls. **Applied and Environmental Microbiology**, 63, 3548-3552, 1997

SIDI, A. L.; COCHET, N.; GHOSE, T. K.; LEBEAULT, J. M. Enzymatic hydrolysis of sugar beet pulp. **Biotechnology Letters**, v. 6, p. 723-728, 1984.

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

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

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

SINGH, S.; MADLALA, A. M.; PRIOR, B. A. 2003. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews**, v. 27, p. 03-16, 2003.

SOARES, M. M. C. N. **Isolamento de linhagens microbianas produtoras de pectinases e caracterização das enzimas**. 1999. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

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

SWEETINGHAM, M. W. Pectic zymograms and taxonomy and pathogenicity of the Ceratobasidiaceae. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 86, p. 305-311, 1986.

TEN HAVE, A. **The *Botrytis cinerea* endopolygalacturonase gene family**. 2000. Thesis - Wageningen University, Wageningen.

TEN HAVE, A.; MULDER, W.; VISSER, J.; van KAN, J.A.L. The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 11, 1009-1016, 1998.

TOBIAS; R. B.; CONWAY, W. S.; SAMS, C. E. Polygalacturonase produced in apple tissue decayed by *Botrytis cinerea*. **Biochemistry And Molecular Biology International**, v. 35, p. 813–823, 1995.

TOBIAS, R., CONWAY, W. AND SAMS, C. Polygalacturonase isozymes from *Botrytis cinerea* grown on apple pectin. **Biochemistry And Molecular Biology International**, v. 30, p. 829-837, 1993

TREJO-HERNÁNDEZ, M. R.; ORIOL, E.; LÓPEZ-CANALES, A.; ROUSSOS, VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Producción de pectinasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida sobre soporte. **Mycology Neotropical Applied**, v. 4, p. 49-62, 1991.

TUDZYNSKI, P.; TUDZYNSKI, B. Genetics of plant pathogenic fungi. **Progress in Botany**, v. 59, p. 169-193, 1998.

TUDZYNSKI, P.; TUDZYNSKI, B. Genetics of phytopathology: phytopathogenic fungi: genetic aspects of host–pathogen interaction. **Progress in Botany**, v. 61, p. 118-147, 2000.

VAN ETEN, H. D.; MANSFIELD, J. W.; BAILEY, J.; FARMER, E. E. Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". **The Plant Cell**, v. 6, p. 1191–1192, 1994.

VACIK, D. N.; TOREN, E. C. J. Separation and Measurement of isoenzymes and other proteins by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 228, p. 1-31, 1982.

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

VIDAL, S.; SALMON, J. M.; WILLIAMS, P.; PELLERIN, P. *Penicillium daleae*, a soil fungus able to degrade rhamnogalacturonan II, a complex pectic polysaccharide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 283-290, 1999.

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

VORAGEN, A. G. J. N. Biothercnological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends Food Science Technology**, v. 9, p. 328-335.

WHITAKER, J.R. Microbial pectinolytic enzymes. In: Fogarty W.M, Kelly C.T, editors. **Microbial Enzymes and Biotechnology**. 2nd ed[M]. London:Elsevier Science Ltd. p.133-176, 1990.

WICKER, L.; VASSALO, M. R.; ECHEVERRIA, E. J. Solubilization of cell wall bound, thermostable from valencia orange. **Journal of Food Science**, v. 4, p. 1171-1180, 1988.

WHITACKER, J. R. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 341-349, 1984.

YAMADA, H. Structural and pharmacological activity of pectic polyssacharides from the roots of *Bupleurum falcatum* L. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, v. 106, p. 229-237, 1995.

YAMADA, H.; HIRANO, M.; KIYOHARA, H. Partial structure of an anti-ulcer pectic polysaccharides from the roots of *Bupleurum falcatum* L. **Carbohydrate Research**, v. 219, p. 173-192, 1991.