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

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
POLIGALACTURONASES TERMOESTÁVEIS PRODUZIDAS PELO
FUNGO *Thermoascus aurantiacus* ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO
SUBMERSA E FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

EDUARDO DA SILVA MARTINS

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

**Rio Claro
Junho de 2006**

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

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
POLIGALACTURONASES TERMOESTÁVEIS PRODUZIDAS PELO
FUNGO *Thermoascus aurantiacus* ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO
SUBMERSA E FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

EDUARDO DA SILVA MARTINS

Orientadora: PROFA. DRA. ELENI GOMES

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

547.29 Martins, Eduardo da Silva
M386p Purificação e caracterização bioquímica de
poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo
Thermoascus aurantiacus através de fermentação submersa
e fermentação em estado sólido / Eduardo da Silva Martins.
– Rio Claro : [s.n.], 2006
108 f. : il., gráfs., tabs.

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

1. Fermentação. 2. Pectinases. 3. Termofílicos. 4.
Processos fermentativos. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedico:

Aos meus pais, aos quais serei eternamente grato por todo o amor e apoio durante toda minha vida.

Aos meus irmãos, pela amizade e carinho.

À minha noiva Luciana, pelo amor, incentivo e compreensão durante todos estes anos.

Vocês são pra mim uma benção de Deus e os melhores exemplos de força, humildade e dedicação que se deve ter na vida. Obrigado por tudo!!!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eleni Gomes, pela valiosa orientação, incentivo e confiança.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva, pelo agradável convívio e esclarecimento de dúvidas durante os trabalhos.

Aos meus pais, grandes incentivadores, pela dedicação e apoio.

Aos meus irmãos, pela amizade e por compartilhar comigo todos os momentos.

Aos meus avós, pelas belas lições de vida.

À Luciana, por todo carinho, força e compreensão.

Aos amigos Denis e Rodrigo pela amizade e pelas conversas sobre a vida, os projetos...

A todos os amigos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, pelos momentos compartilhados durante os últimos anos: Alexandre, Aline, Ana Flávia, Ana Paula, Caio, Carol, Daniela, Ellen, Érika, Fabiana, Gisele, Heloíza, Marcelo, Maricy, Natália, Paula, Solange, Tony e Viviane.

Ao Hamilton, pelo auxílio em algumas etapas do trabalho.

À Cíntia e ao Bruno, pela ajuda no Abstract.

Aos funcionários da seção de pós-graduação do Instituto de Biociências de Rio Claro, pela atenção.

À FAPESP, pelo suporte financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

A Deus, por tudo.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vii
I- RESUMO	1
II- ABSTRACT	3
III- INTRODUÇÃO	5
1- Substâncias pécticas.....	5
2- Enzimas do complexo pectinolítico (pectinases).....	7
2.1- Protopectinases	7
2.2- Enzimas desesterificantes: Pectinesterases.....	8
2.3- Enzimas despolimerizantes	8
2.3.1- Hidrolases: Poligalacturonases e Polimetilgalacturonases.....	8
2.3.2- Liases: Pectina liases e Pectato liases.....	9
3- Aplicações industriais das pectinases.....	10
4- Produção de pectinases microbianas por fermentação submersa e fermentação em estado sólido.....	12
5- Produção de pectinases por microrganismos termofílicos	20
5.1- Adaptações moleculares à termofilia	22
6- Purificação e propriedades bioquímicas de pectinases microbianas.....	24
IV- OBJETIVOS	33
1- Geral.....	33
2- Específicos	33
V- MATERIAL E MÉTODOS	35
1- Microrganismo	35
2- Meios de cultivo	35
2.1- Meio de manutenção.....	35
2.2- Meio para a fermentação submersa e obtenção da enzima	35
2.2.1- Escolha do meio basal.....	35
2.2.2- Estudo de fontes de carbono alternativas.....	38
2.2.3- Fermentação e obtenção da enzima.....	38

3- Planejamento experimental para o estudo dos fatores pH inicial do meio de cultivo e temperatura de fermentação	39
4- Meio para a fermentação em estado sólido e obtenção da enzima	39
5- Medida da atividade enzimática	40
6- Caracterização físico-química das pectinases	41
6.1- Determinação do efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas	41
6.2- Determinação da estabilidade térmica e estabilidade frente às variações de pH	41
7- Protocolo de purificação das enzimas	42
7.1- Diálise e concentração	42
7.2- Aplicação na filtração em gel	42
7.3- Aplicação na troca iônica	42
8- Eletroforese em PAGE-SDS para avaliação da pureza das enzimas e determinação da massa molar	43
9- Caracterização físico-química das poligalacturonases puras	44
10- Avaliação da especificidade ao substrato das poligalacturonases puras	44
11- Determinação do efeito de íons metálicos sobre a atividade das enzimas purificadas	44
12- Determinação do K_m e $V_{máx}$	44
13- Focalização isoeétrica e determinação do ponto isoeétrico	45
14- Identificação dos produtos de hidrólise	45
15- Medida de proteínas totais	45
VI- RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
1- Produção de poligalacturonase em fermentação submersa, utilizando pectina comercial como fonte de carbono	46
2- Produção de poligalacturonase em fermentação submersa, utilizando diferentes resíduos agro-industriais como substrato	52
3- Produção de poligalacturonase em fermentação submersa, utilizando água amarela como substrato	54
4- Efeito do pH inicial e da temperatura de fermentação sobre a produção de PG na água amarela	57
5- Caracterização físico-química das poligalacturonases produzidas em FES e FSM	58
5.1- Efeito do pH sobre a atividade das enzimas	59
5.2- Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas	60

5.3- Determinação da estabilidade das enzimas frente a variações de pH e temperatura.....	62
6- Purificação das enzimas	66
6.1- Fracionamento das poligalacturonases produzidas em FES e FSM em cromatografia de filtração em gel.....	66
6.2- Fracionamento das poligalacturonases produzidas em FES e FSM em cromatografia de troca iônica.....	68
7- Eletroforese em SDS-PAGE para avaliação da pureza das enzimas e determinação da massa molar	72
8- Caracterização físico-química das poligalacturonases puras.....	74
8.1- Efeito do pH sobre a atividade das enzimas puras	74
8.2- Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas puras	75
8.3- Determinação da estabilidade das enzimas puras frente a variações de pH e temperatura.....	77
9- Avaliação da especificidade ao substrato das poligalacturonases puras	82
10- Determinação do efeito de íons metálicos sobre a atividade das enzimas purificadas.....	83
11- Determinação do K_m e $V_{máx}$	85
12- Focalização isoeletrica e determinação do ponto isoeletrico	86
13- Identificação dos produtos de hidrólise	86
VII- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
VIII- CONCLUSÕES	93
IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da parede celular vegetal, contendo as moléculas de pectina	6
Figura 2: Pontos de ataque das pectinases na molécula de pectina	7
Figura 3: Produção de poligalacturonase pelo fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> através da fermentação submersa de diferentes meios de cultivo, com a pectina esterilizada junto ao meio nutriente..	47
Figura 4: Produção de poligalacturonase pelo fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> através de FSM de diferentes meios de cultivo, com a pectina esterilizada separada do meio nutriente	51
Figura 5: Produção de poligalacturonase pelo fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> através de FSM em meios de cultivo contendo resíduos agro-industriais.....	53
Figura 6 : Produção de poligalacturonase pelo fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> através da fermentação da água amarela.	56
Figura 7: Produção de PG pelo fungo <i>Thermoascus aurantiacus</i> na água amarela, em diferentes valores de pH inicial e de temperatura de fermentação.	57
Figura 8: Efeito do pH sobre a atividade das pectinases brutas produzidas por <i>Thermoascus aurantiacus</i> em FES em meio de 30% de bagaço de cana e 70% de laranja e em FSM na água amarela	59
Figura 9: Efeito da temperatura sobre a atividade das pectinases brutas produzidas por <i>Thermoascus aurantiacus</i> através de FES em meio de 30% de bagaço de cana e 70% de laranja e em FSM na água amarela..	61
Figura 10: Estabilidade das pectinases brutas produzidas pelo fungo termofílico <i>Thermoascus aurantiacus</i> através de FES em meio de 30% de bagaço de cana e 70% de laranja e em FSM na água amarela, frente a variações de pH, em ausência de substrato	63
Figura 11: Estabilidade à temperatura das pectinases brutas produzidas por <i>Thermoascus aurantiacus</i> através de FES em meio de 30% de bagaço de cana e 70% de laranja e em FSM na água amarela por 1 hora, em diferentes temperaturas.....	64

Figura 12: Perfil de eluição das poligalacturonases produzidas por <i>Thermoascus aurantiacus</i> aplicadas em coluna de cromatografia de filtração em gel, contendo gel Sephadex G-75. A- Fermentação Submersa (FSM); B- Fermentação em Estado Sólido (FES)	67
Figura 13: Perfil de eluição das poligalacturonases produzidas por <i>Thermoascus aurantiacus</i> aplicadas na coluna de cromatografia de troca iônica SP Sepharose.....	69
Figura 14: Eletroforese das poligalacturonases produzidas por <i>T. aurantiacus</i>	72
Figura 15: Reta padrão obtida pela plotagem do log da massa molar dos padrões <i>versus</i> da migração relativa (cm) de cada padrão e das enzimas	73
Figura 16: Efeito do pH sobre a atividade das pectinases de <i>Thermoascus aurantiacus</i> purificadas. Tampões: acetato 2,5-5,5; citrato 5,5-7,0; tris-HCl 7,0-8,5; glicina 8,5- 9,5.....	74
Figura 17: Efeito da temperatura sobre a atividade das pectinases de <i>Thermoascus aurantiacus</i> purificadas.....	76
Figura 18: Estabilidade das poligalacturonases de <i>Thermoascus aurantiacus</i> purificadas, frente a variações de pH, em ausência de substrato.	78
Figura 19: Estabilidade à temperatura das PGs de <i>T.aurantiacus</i> purificadas, quando incubadas por 1 hora, em diferentes temperaturas.....	80
Figura 20: Tempo de estabilidade das PGs de <i>T.aurantiacus</i> purificadas, quando incubadas a 60°C em diferentes intervalos de tempo	81
Figura 21: Especificidade ao substrato das PGs puras do fungo <i>T. aurantiacus</i>	82
Figura 22: Produtos de hidrólise da atividade das poligalacturonases puras em pectina de citrus (2% de esterificação – Sigma), após 10 min de incubação.....	87
Figura 23: Produtos de hidrólise da atividade das poligalacturonases puras em ácido trigalacturônico– Sigma), após 10 min de incubação.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cromatografias utilizadas na purificação de proteínas e suas características.	26
Tabela 2: Tratamentos aplicados no experimento fatorial 3 x 2.....	39
Tabela 3: Purificação da poligalacturonase produzida por <i>T. aurantiacus</i> em fermentação submersa.....	71
Tabela 4: Purificação da poligalacturonase produzida por <i>T. aurantiacus</i> em fermentação em estado sólido	71
Tabela 5: Atividade específica de endo-PG das poligalacturonases purificadas de <i>T. aurantiacus</i>	71
Tabela 6: Influência de diferentes íons e do EDTA sobre a atividade das PGs purificadas.....	83
Tabela 7: Resumo das principais características das poligalacturonases puras do fungo <i>T. aurantiacus</i>	90

I- RESUMO

Pectinases termoestáveis apresentam características interessantes do ponto de vista da sua aplicação industrial, como alta estabilidade ao pH e à temperatura. Além disso, o tipo de processo fermentativo pode influenciar a produção e propriedades físico-químicas destas enzimas. A produção de poligalacturonase (PG) pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* foi realizada em fermentação submersa (FSM) e em estado sólido (FES), usando substratos contendo pectina comercial ou subprodutos agro-industriais como fonte de carbono. A PG bruta obtida em FES apresentou atividade ótima a 65°C e pH 5,0, com estabilidade na faixa de pH entre 4,0 e 5,0 e entre 7,5 e 8,5 e manteve 85% da atividade original quando incubada a 60°C, por 1 hora. Em FSM, o melhor meio de cultivo foi a água amarela, com pH inicial de 5,5, após 5 dias de cultivo a 45°C. A enzima em sua forma bruta apresentou temperatura ótima de 60°C e pH ótimo de 5,0, maior estabilidade em pH ácido (3,0 a 4,5) e menor termoestabilidade, quando comparada com a obtida em FES, mantendo apenas 13% da atividade original quando incubada a 60°C, por 1 hora. As enzimas foram purificadas utilizando-se cromatografias de filtração em gel e troca iônica. A PG purificada proveniente da FSM apresentou pH e temperatura ótimos de 5,5 e 60-65°C, estabilidade em pH 5,0-5,5 e manteve, após 1 hora de incubação, 100% da atividade original até 50°C. Resultados similares foram obtidos para a PG proveniente da FES. A PG de FES apresentou massa molar de 29,3 kDa, Km de 1,58 mg/mL e $V_{m\acute{a}x}$ de 1553,1 μ mol/min/mg, enquanto que a da FSM apresentou massa molar de 30,1 kDa, km de 1,46 mg/mL e $V_{m\acute{a}x}$ de 2433,3 μ mol/min/mg. Íons como Fe^{+3} , Ca^{+2} , e K^{+} praticamente não afetaram a atividade da enzima, enquanto que Mg^{+2} , Mn^{+2} e Zn^{+2} promoveram, respectivamente 7%, 75% e 50%

de redução da atividade da PG obtida da FSM e 24%, 77% e 59% da PG obtida da FES. O íon Hg^{+2} inibiu totalmente a atividade das duas PGs. A determinação dos produtos de hidrólise sugere que as enzimas exibem um mecanismo de ação misto endo/exo, uma vez que liberam, em quantidades expressivas, ácidos oligo, tri, di e monogalacturônicos. Os dados sugerem que o processo fermentativo empregado interferiu na quantidade de enzima produzida, porém não interferiu na maioria das propriedades bioquímicas das poligalacturonases, com exceção da termoestabilidade.

Palavras-chave: purificação, poligalacturonases, *Thermoascus aurantiacus*, fermentação submersa, fermentação em estado sólido.

II- ABSTRACT

Thermostable pectinases present important characteristics under the view of their industrial application, as their high stability to pH and temperature. Besides, the type of fermentative process used can affect their production and physical-chemical properties. The polygalacturonase (PG) production by the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* was carried out by submerged fermentation (SMF) and solid state fermentation (SSF) using substrates containing commercial pectin or agro-industrial residues as carbon sources. The crude PG from SSF presented optimum activity at 65°C and pH 5.0, with stability at pH 4.0-5.0 and 7.5-8.5 and maintained 85% of its original activity at 60°C for 1 hour. In SMF the best cultivation medium was the liquid waste from juice extraction, with initial pH of 5.5, after 5 days of cultivation at 45°C. The crude enzyme showed an optimum activity at 60°C and pH 5.0, higher stability in acidic pH (3.0 to 4.5) and was less thermostable when compared to that obtained in SSF, which maintained only 13% of its original activity at 60°C, for 1 hour. Purification of enzymes was carried out using filtration and ion-exchange chromatographies. The purified PG, from SMF, showed optimum pH and temperature of 5.5 and 60-65°C, stability at pH 5.0-5.5 and preserved, after 1 hour incubation, 100% of its original activity at 50°C. Similar results were obtained to PG from SSF. The PG obtained by SSF presented molar mass of 29.3 kDa, K_m of 1.58 mg/ml and V_{max} of 1553.1 μ mol/min/mg, while that the enzyme from SMF presented molar mass of 30.1 kDa, K_m of 1.46 mg/ml and V_{max} of 2433.3 μ mol/min/mg. Ions such as Fe^{3+} , Ca^{2+} and K^+ practically did not affect the enzyme activity, while Mg^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} decreased 7%, 75% and 50% of PG activity and 24%, 77% and 59% of that obtained by SSF. The Hg^{2+} inhibited the

activities of both PGs. The determination of hydrolysis products suggested that the enzymes present a mixed mechanism endo/exo action, since they released expressive quantities of oligo, tri, di, and monogalacturonic acids. The data suggest that the fermentative process used influenced in the quantity of enzyme obtained, but did not influence in several of the biochemical properties of the polygalacturonases, with exception of the thermostability.

Keywords: purification, polygalacturonases, *Thermoascus aurantiacus*, submerged fermentation, solid-state fermentation.

III- INTRODUÇÃO

1- Substâncias pécticas

Substâncias pécticas são polissacarídeos ácidos coloidais, constituídos de uma cadeia principal de resíduos de ácido galacturônico ligados por ligações α (1 \rightarrow 4) e cadeias laterais contendo L-ramnose, arabinose, galactose e xilose. Os grupos carboxílicos do ácido galacturônico podem ser esterificados por grupos metil e, parcial ou completamente, neutralizados por íons sódio, potássio ou amônio. Alguns dos grupos hidroxilas nos carbonos C2 e C3 podem aparecer acetilados (FOGARTY e WARD, 1972).

Baseado nos tipos de modificações da cadeia principal, as substâncias pécticas são classificadas em (ROMBOUTS e PILNIK, 1980):

A- protopectina: é o termo usado para descrever as substâncias pécticas insolúveis em água, das quais se originam as substâncias pécticas solúveis.

B- ácido péctico: são os ácidos poligalacturônicos cujos grupos carboxílicos não apresentam esterificados com grupos metila.

C- ácido pectínico: são os ácidos poligalacturônicos que contêm quantidades variáveis de grupos metoxílicos. Estes compostos apresentam a propriedade de formar gel na presença de açúcares e cátions divalentes.

D- pectina: é o nome genérico de misturas pécticas que contêm ácido pectínico como maior componente.

As substâncias pécnicas são os maiores componentes da lamela média e parede celular primária das células vegetais, estando interligadas a outros polissacarídeos estruturais, como a celulose e a hemicelulose (Fig. 1). Além da função adesiva que exercem nas paredes celulares das plantas superiores, estas também são responsáveis pelas diferenças de textura das frutas e dos vegetais durante o seu crescimento, amadurecimento e armazenamento. As pectinas têm sido indicadas ainda como importante fator de interação entre plantas e seus patógenos (ROMBOUTS e PILNIK, 1980).

As substâncias pécnicas são usadas na indústria de alimentos como agentes geleificantes e como fibras nutricionais (ALKORTA et al, 1998). Por outro lado, podem representar um problema nas várias etapas do processamento de frutas e vegetais, visto que seu arraste, após o rompimento da parede celular, pode causar turbidez em sucos ou incrustações em tubulações e reatores industriais.

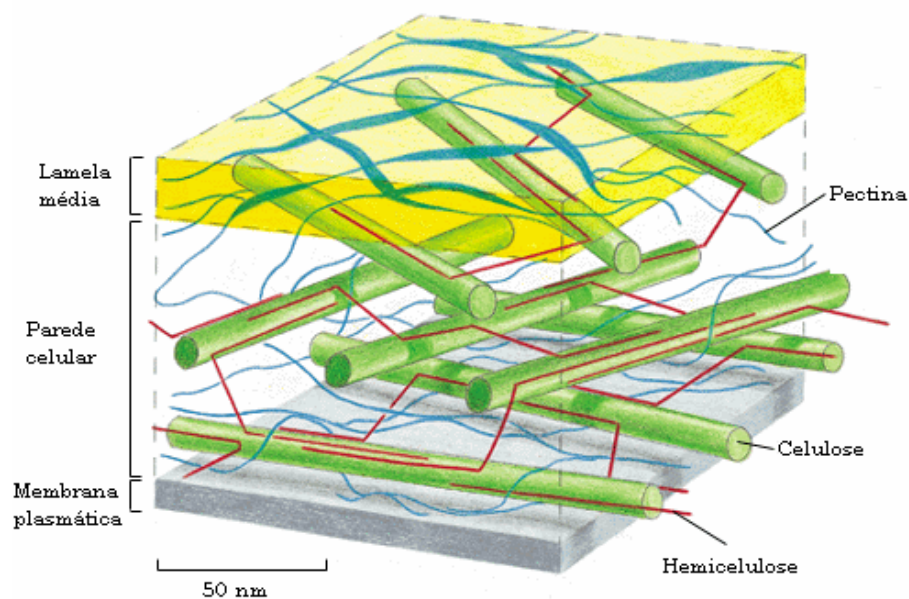


Figura 1: Estrutura da parede celular vegetal, contendo as moléculas de pectina (modificada- figura original disponível na página www.enzymes.co.uk/answer24.pectinase.htm).

2- Enzimas do complexo pectinolítico (pectinases)

As pectinases constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécicas presentes no material vegetal. A classificação destas enzimas é baseada no modo de ataque à cadeia de ácido galacturônico dos polímeros pécicos, sendo descritos três tipos de enzimas: as desesterificantes (pectinesterases), 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, ROMBOUITS e PILNIK, 1980, KASHYAP et al., 2001). Os pontos de ataque das enzimas pécicas na molécula de pectina estão representados na figura 2.

Figura 2: Pontos de ataque das pectinases na molécula de pectina (ROMBOUITS e PILNIK, 1980).

2.1- Protopectinases

São enzimas que solubilizam as protopectinas, formando pectina solúvel altamente polimerizada (KASHYAP et al., 2001). Estas ainda podem ser divididas em tipo A, que

atuam na região do ácido poligalacturônico da protopectina e tipo B, que atuam nas cadeias de polissacarídeos que conectam as cadeias de ácido poligalacturônico aos constituintes da parede celular vegetal.

2.2- Enzimas Desesterificantes: Pectinesterases

São enzimas que atuam removendo grupos metoxílicos das substâncias pécnicas com alto grau de metoxilação, formando ácido péctico ou pectina de baixa metoxilação, que pode ser hidrolisada pelas poligalacturonases. As pectinesterases são produzidas por fungos, bactérias, leveduras e pelas plantas superiores e estão presentes em praticamente todos os preparados comerciais de enzimas pécnicas.

2.3- Enzimas despolimerizantes

São enzimas que rompem as ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) entre os monômeros de ácido galacturônico das substâncias pécnicas, podendo atuar por hidrólise (hidrolases) ou por β -eliminação (liases).

2.3.1- Hidrolases: Poligalacturonases e Polimetilgalacturonases

As poligalacturonases (PG) catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) no ácido péctico. Estas podem ser de dois tipos:

A- Endo-poligalacturonases: atuam pela hidrólise das ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) internas do ácido poligalacturônico de forma aleatória, causando a despolimerização da molécula. São produzidas por uma grande variedade de organismos, como fungos, bactérias e leveduras, plantas superiores e nematóides parasitas de plantas.

B- Exo-poligalacturonases: são enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) alternadas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora. Estas podem ainda ser subdivididas em dois tipos:

B.1- Exo-poligalacturonase 1: hidrolisa ligações glicosídicas ? (1? 4) alternadas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora liberando monômeros de ácido galacturônico.

B.2- Exo-poligalacturonase 2: atua de maneira similar à Exo-poligalacturonase 1, porém libera ácidos digalacturônicos livres.

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

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

2.3.2- Liases: Pectina liases e Pectato liases

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

As polimetilgalacturonato liases (pectina liases) são enzimas que atuam na quebra da molécula de pectina por um mecanismo de trans-eliminação de hidrogênio, a partir da ligação entre os carbonos 4 e 5 do ácido galacturônico. A sua ação provoca um aumento da absorbância a 235 nm, devido à formação de uma dupla ligação entre os carbonos envolvidos na reação. Estas podem ser divididas em:

A- endo-polimetilgalacturonato liases: catalisam de forma aleatória a ruptura das ligações ? (1? 4) da pectina.

B- exo-polimetilgalacturonato liases: catalisam a ruptura das ligações ? (1? 4) da molécula de pectina a partir da extremidade não redutora.

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

3- Aplicações industriais das pectinases

As primeiras aplicações comerciais das pectinases foram realizadas em 1930 na produção de vinhos e sucos de frutas. A partir dos anos 60, com a maior elucidação da natureza química dos tecidos vegetais, a utilização destas enzimas vem sendo feita em vários outros processos (KASHYAP et al., 2001; JAYANI et al., 2005). Além disso, a otimização de parâmetros fermentativos, a purificação e o estudo de suas propriedades bioquímicas tem proporcionado um uso mais eficiente destas como catalisadores, nos diferentes processos em que são aplicadas (GUMMADI e PANDA, 2003; LANG e DÖRNENBURG, 2000).

As substâncias pécticas representam cerca de 0,5 a 4% do peso total das frutas e são responsáveis pela consistência, turbidez e aparência dos sucos obtidos. Quando a fruta é moída, a célula se rompe liberando a fase aquosa. Uma fração da pectina, chamada solúvel, distribui-se nessa fase aquosa (suco) e a outra, chamada insolúvel, permanece ligada à parede celular, compondo a polpa. Esta última fração dificulta a extração do suco por prensagem ou por outros métodos mecânicos. Com adição de pectinases à polpa, a estrutura do gel entra em colapso em função da degradação das moléculas de pectina e o suco é mais facilmente obtido, aumentando o seu rendimento. A pectina solúvel, por sua vez, promove turbidez da fase aquosa (suco) e formação de gel, que pode precipitar levando à separação de fases no suco, além da perda de cor (DA SILVA et al., 1997).

Em muitos tipos de sucos, principalmente os cristalinos, a clarificação dos mesmos é necessária para manter a uniformidade do produto, tornando-o mais atraente ao consumidor (SREENATH e SANTHANAM, 1992). Assim, as pectinases são utilizadas para a estabilização da cor e do “flavour” dos sucos (SOLEHAH et al., 1994). O processo

de clarificação, requerido para facilitar a filtração e remover a turbidez do suco, representa a mais antiga aplicação destas enzimas (ROMBOUTS e PILNIK, 1980).

A presença das substâncias pécticas também pode causar problemas de geleificação durante a concentração dos sucos, dificultando a retirada da água e podendo causar o entupimento de filtros e a diminuição da velocidade do processamento. A adição de pectinases resulta em uma rápida redução da viscosidade, bem como na flocculação destas micelas presentes (ALKORTA et al., 1998), permitindo que estas partículas possam ser separadas por sedimentação ou filtração (SOARES, 1999).

As enzimas que degradam a parede celular das células vegetais, incluindo as pectinases, podem ser usadas também na extração de óleo vegetal. Recentemente, preparados comerciais destas enzimas têm sido usados na produção do óleo de oliva. Por romperem a parede celular, elas facilitam a liberação do óleo nas técnicas de separação, aumentando o rendimento de extração (KASHYAP et al., 2001).

Na produção de vinhos, as pectinases podem atuar tanto na clarificação do vinho branco, por degradação da pectina em suspensão, quanto na retenção de cor do vinho tinto, uma vez que a ação das mesmas facilita a liberação do pigmento da casca durante a fermentação, além de facilitarem a prensagem para a sua extração. As pectinases produzidas por fungos, principalmente de *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* e *Botrytis cinerea*, são utilizadas para este propósito (KASHYAP et al., 2001).

As pectinases desempenham também um importante papel na fermentação de chá e café. A fermentação do café utilizando microrganismos pectinolíticos é usada para remover a camada de mucilagem e parte das substâncias pécticas do grão. Na produção de chás, o tratamento enzimático acelera a fermentação e melhora as propriedades dos chás em pó instantâneos, devido à degradação da pectina. O grau de hidrólise da pectina tem fundamental importância econômica nas indústrias de processamento de chá e café, devido ao seu papel significativo no rendimento da produção e na qualidade final do produto (BOCCAS et al., 1994; JAYANI et al., 2005).

Na indústria têxtil, a adição de enzimas pectinolíticas facilita a separação das fibras de celulose, através da degradação das moléculas de pectina interligadas à hemicelulose. Estas enzimas vêm sendo aplicadas na degomagem de fibras derivadas da juta, rami e outros vegetais, utilizados na fabricação de diversos materiais, como roupas, fios e lonas. Estas fibras contêm aproximadamente 20% a 35% de material gomoso incrustado constituído principalmente de pectina, o qual precisa ser removido para a utilização industrial das mesmas. Tradicionalmente, a remoção é feita por processos de degomagem química com soluções alcalinas aquecidas, que geram resíduos prejudiciais ao ambiente e apresentam um alto consumo de energia. Uma das soluções para estes problemas vem sendo a utilização de processos biotecnológicos que envolvem a utilização de pectinases ou combinações de pectinases e xilanases, que, além de representar uma alternativa econômica, não provoca danos ao ambiente (KAPOOR et al., 2001).

As enzimas pécticas representam cerca de 25% da produção de enzimas utilizadas em alimentos. O valor de mercado estimado de todas as enzimas industriais em 1995 era de US\$ 1 bilhão, sendo que US\$ 75 milhões era representado pelas pectinases. O estimado para o mercado em 2005 é de US\$ 1,7-2,0 bilhões, com tendência ao aumento da participação das pectinases nesse montante (KASHYAP et al., 2001).

4- Produção de pectinases microbianas por fermentação submersa e fermentação em estado sólido

A composição dos complexos pectinolíticos de origem microbiana varia de acordo com a espécie do microrganismo produtor e, dessa forma, a seleção de isolados capazes de sintetizar enzimas com propriedades adequadas a cada processo é um processo fundamental para a utilização industrial das mesmas. Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são de grande interesse na produção de enzimas em virtude das inúmeras vantagens apresentadas por estes organismos, tais como (BRAVO et al., 2000): o crescimento é rápido, não requerem amplos espaços para o seu crescimento; são capazes de degradar variados substratos, inclusive resíduos e subprodutos agro-industriais.

As preparações de pectinases mais comumente utilizadas são de origem fúngica, principalmente de *Aspergillus e Penicillium* (PANDEY et al., 2000a; GUMMADI e PANDA, 2003). No entanto, o estudo de outros microrganismos produtores é fundamental para a obtenção de enzimas com características distintas, adequadas a materiais e processos industriais específicos (SATHISH-KUMAR e PALANIVELU, 1998).

A produção de enzimas por microrganismos é afetada por diversos fatores como o tipo de processo fermentativo (submersa ou em estado sólido), o tempo de fermentação, o tipo de substrato e fatores físico-químicos como umidade, concentração de oxigênio, pH e temperatura (HESSELTINE, 1972; PANDEY, 1992; PANDEY et al., 2000a).

A fermentação em estado sólido (FES), associada a diferentes organismos, sempre representou um importante instrumento para a obtenção de produtos de interesse econômico (AIDOO et al., 1982). Este processo tem-se mostrado muito promissor no desenvolvimento de vários bioprocessos, como na biorremediação e biodegradação de compostos tóxicos, desintoxificação de resíduos e subprodutos agro-industriais, biotransformação de resíduos de colheitas para enriquecimento nutricional e na obtenção de produtos de alto valor agregado, como metabólitos secundários (antibióticos, alcalóides, fatores de crescimento vegetal, etc), ácidos orgânicos, biopesticidas, biocombustíveis, compostos aromáticos e enzimas (PANDEY et al., 2000a; RODRÍGUEZ COUTO e SANROMÁN, 2005).

A FES apresenta uma série de vantagens em relação à submersa (FSM). Dentre estas vantagens, destacam-se (AIDOO et al., 1982; CANNEL e MOO-YOUNG, 1980; HESSELTINE, 1972; RODRÍGUEZ COUTO e SANROMÁN, 2005):

- 1- Geralmente há uma maior concentração dos produtos formados.
- 2- O espaço necessário para equipamentos é relativamente menor, pois uma pequena quantidade de água é usada, o substrato é concentrado e o requerimento energético é menor.
- 3- No caso da utilização de fungos, as condições nas quais estes crescem são mais similares às de seu habitat natural.

4- Por estar próximo ou na ausência de água livre, a FES reduz significativamente os riscos de contaminação bacteriana. Esta propriedade torna-se ainda mais notável quando se utilizam microrganismos termofílicos, devido à redução da contaminação por mesofílicos.

5- Apresenta um especial interesse nos países em que há abundância de biomassa e de subprodutos agro-industriais, que podem ser utilizados como substratos para o desenvolvimento de vários produtos.

Nos últimos anos, houve uma crescente tendência em se utilizar o processo de fermentação em estado sólido para obtenção de enzimas, considerando a maior produção, menor repressão catabólica e, ainda, esse processo geralmente permite a obtenção de proteínas com maior termoestabilidade e tolerância ao pH (SOLÍS-PEREIRA et al., 1993; AGUILAR et al., 2004; RODRÍGUEZ COUTO e SANROMÁN, 2005).

A seleção do substrato para os processos de FES depende de vários fatores, principalmente aqueles relacionados ao seu custo e eficiência. Neste contexto, a utilização de subprodutos agro-industriais torna-se um atrativo para este processo. A aplicação destes materiais em bioprocessos tornou-se importante sob o ponto de vista ambiental, reduzindo problemas relacionados ao seu manejo inadequado e conseqüentes danos ambientais. Além disso, seu baixo custo e grande disponibilidade fazem dos mesmos excelentes substratos alternativos para vários processos industriais (MARTINS et al., 2002; PANDEY et al., 2000b; SILVA et al., 2005).

Para a seleção do substrato duas considerações são importantes. A primeira é que este deve ter boa disponibilidade e agregar valor ao produto de interesse. A outra é que o mesmo deve proporcionar uma boa produção do produto desejado (PANDEY, 2002). Nos estudos de produção de pectinases, inúmeros subprodutos agrícolas e agro-industriais têm sido testados como substratos alternativos (RODRÍGUEZ COUTO e SANROMÁN, 2005).

MALDONADO et al. (1986) estudaram a produção de pectinesterase e endopoligalacturonase por *Aspergillus* sp em FES, usando casca de limão como fonte de carbono. Este substrato também foi utilizado com sucesso na produção de

poligalacturonase por *Aspergillus* sp CH-Y-1043, conforme relatado por LARIOS et al. (1989).

HOURS et al. (1988) relataram a produção de endo-poligalacturonase por *Aspergillus foetidus* através de FES, utilizando polpa de maçã como substrato. A maior atividade obtida foi 1062 U/g, após 48 horas de cultivo. Este material também proporcionou uma boa produção de PG por *Penicillium expansum*, segundo YAO et al (1996).

Os estudos com a utilização de bagaço de laranja têm mostrado que este material pode proporcionar uma alta produção de enzimas pectinolíticas por diversas linhagens microbianas. GARZÓN e HOURS (1992) relataram a produção de endo-poligalacturonase por *Aspergillus foetidus* em FES, utilizando esse material. A máxima atividade obtida foi 1.687,0 U/g, após 60 horas de cultivo. ISMAIL (1996) também obteve um complexo enzimático contendo pectinase, celulase e xilanase utilizando bagaço de laranja como substrato para o crescimento de seis linhagens fúngicas.

O bagaço de cana-de-açúcar também tem sido usado na produção de pectinases (ACUÑA-ARGÜELLES et al., 1994). Entretanto, esse material é geralmente usado como substrato inerte, requerendo suplementação de fonte de carbono e nitrogênio para sustentar o crescimento de microrganismos não celulolíticos. Sua importância está na diminuição do grau de compactação do meio, permitindo uma melhor aeração e troca de calor (OOIJKAAS et al., 2000).

ZHENG e SHETTY (2000) estudaram a produção de poligalacturonase por *Lentinus edodes*, através de FES em polpa de maçã e de morango. Os resultados mostraram que a polpa de morango foi um bom substrato para a produção da enzima, proporcionando atividade máxima de 29,4 U/g.

COURI et al. (2000) relataram a produção das enzimas poligalacturonase, xilanase e protease por *Aspergillus niger* 3T5B8 através da fermentação de casca de banana, de manga e farelo de trigo. Os resultados mostraram que a casca de manga e o farelo de trigo foram os melhores substratos para a produção das enzimas. O farelo de trigo também foi

utilizado com sucesso na produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* (CASTILHO et al., 1999).

SILVA et al. (2002) estudaram a produção de poligalacturonase pelo fungo *Penicillium viridicatum* RFC3, utilizando diferentes materiais como substrato, como bagaço de laranja, tegumento de milho, farelo de trigo e casca de banana e manga, sendo testadas também diferentes combinações destes materiais. Os resultados mostraram que a maior produção da enzima ocorreu quando foi utilizado bagaço de laranja e farelo de trigo, combinados na proporção de 1:1 (55,0 U/g). A enzima fracionada em gel filtração em resina Sephadex G-50 apresentou pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 55°C e foi estável na faixa de pH neutro e a 40°C, quando incubada por 1 hora nesta temperatura.

MARTIN et al. (2004) relataram a produção de poligalacturonase e pectina liase por diferentes linhagens de fungos isolados de material vegetal em decomposição, sendo selecionados para estudos posteriores as linhagens fúngicas *Moniliella* sp SB9 e *Penicillium* sp EGC5, que apresentaram boa produção de ambas as enzimas quando cultivadas em substrato composto por uma mistura de bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (1:1:1). As enzimas PG e PL produzidas por *Moniliella* sp SB9 apresentaram pH ótimo de 4,5 e 10,0 e temperatura ótima de 55°C e 45°C, respectivamente. As mesmas enzimas, produzidas por *Penicillium* sp EGC5 mostraram pH ótimo de 4,5-5,9 e 9,0, respectivamente. Neste caso, a temperatura ótima de ambas foi de 40°C.

SILVA et al. (2005) estudaram a produção de pectinases pelo fungo *Penicillium viridicatum* em FES, utilizando mistura de farelo de trigo e bagaço de laranja (1:1) como substrato. As maiores produções das enzimas endo-PG, exo-PG e PL foram de 0,7 U/mL, 8,9 U/mL e 100,0 U/mL, respectivamente.

Vários outros subprodutos agro-industriais também têm sido utilizados como substratos na produção de enzimas pectinolíticas, tais como farelo de soja (CASTILHO et al., 2000), polpa e casca de café (ANTIER et al., 1993; BOCCAS et al., 1994) e polpa de cacau (SCHWAN et al., 1997).

A fermentação em estado sólido também tem sido usada para obtenção de pectinases bacterianas. SOARES et al. (2001) obtiveram boa produção de pectinases por cinco linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Bacillus*, através de FES de farelo de trigo. A atividade máxima de exo-PG foi 40,0 U/g, após 120 horas de fermentação.

Na literatura há vários relatos de produção de pectinases em fermentação submersa, com alguns trabalhos avaliando a possibilidade de utilização de subprodutos agro-industriais como fonte de carbono para o crescimento microbiano. Este processo pode apresentar algumas vantagens em relação à fermentação em estado sólido, como a maior facilidade de controle de parâmetros fermentativos, como pH e temperatura. Além disso, na fermentação submersa o acesso ao substrato é mais homogêneo e não há problemas com relação à disponibilidade de água (AIDOO et al, 1982; RODRÍGUEZ COUTO e SANROMÁN, 2005).

LARIOS et al. (1989) relataram a produção de endo-poligalacturonase (endo-PG) e exo-poligalacturonase (exo-PG) pelo fungo *Aspergillus* sp CH4-1043, em meio líquido contendo casca de limão como indutor. A atividade de endo-PG em meio contendo casca de limão foi de 26,17 U/mL, e quando cultivado em meio contendo pectina este valor foi de 6,08 U/mL. A adição da casca de limão praticamente não alterou a produção de exo-PG (24,0 U/mL), quando comparada com a obtida em meio com pectina (23,7 U/mL).

Resultados similares foram obtidos por FONSECA e SAID (1994), que compararam a produção de endo-poligalacturonase por *Tuberlaria vulgaris* em FSM utilizando polpa de laranja e pectina como indutores da enzima. Os autores observaram que a primeira foi mais eficiente (0,44 U/mL) em comparação com a pectina (0,18 U/mL).

GALIOTOU-PANAYOTOU et al. (1997) estudaram as condições ótimas de crescimento de *Aspergillus* sp ATHUM 3482, visando a produção de poligalacturonase através de FSM. Os autores investigaram a influência do tempo de cultivo, da fonte de nitrogênio e da temperatura sobre a produção da enzima. A maior produção ocorreu após 3 dias de cultivo e o fosfato de amônia foi a fonte de nitrogênio que propiciou maior atividade enzimática (1,1 U/mL). A melhor temperatura de cultivo do fungo para a produção da enzima foi 25°C, na qual a atividade foi elevada a 3,2 U/mL.

MINUSSI et al. (1998) relataram a produção de poligalacturonase e pectina liase por *Penicillium griseoroseum* na presença de caldo de cana-de-açúcar. Foi observado que o caldo de cana, mesmo em baixas concentrações, foi capaz de induzir a produção das enzimas. Os autores enfatizaram que o estudo de indutores alternativos como substitutos da pectina visam principalmente reduzir os custos de produção das pectinases.

BLANDINO et al. (2001) testaram o farelo de trigo e pectina comercial como substrato para a produção de pectinases pelos fungos *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus awamori*. Segundo os autores, o farelo de trigo proporcionou boa produção das enzimas endo e exo-poligalacturonase pelos dois fungos estudados. No entanto, o tipo de substrato utilizado influenciou de forma diferente a produção das mesmas. A endo-PG do *Aspergillus awamori* apresentou a mesma atividade máxima nos dois substratos (0,005 U/mL), enquanto de a produção desta enzima pelo *Rhizopus stolonifer* foi maior quando foi usado farelo de trigo (0,004 U/mL), em relação à pectina (0,0035 U/mL). A atividade da exo-PG de *A. awamori* foi maior no meio com pectina (0,05 U/mL), enquanto que a do *R. stolonifer* foi maior quando usou-se o farelo de trigo.

KAPOOR et al. (2001) relataram a produção de uma poligalacturonase alcalina e termoestável da linhagem *Bacillus* sp. MG-cp-2, em meio líquido contendo pectina como substrato.

Embora existam vários trabalhos relacionados à produção de pectinases em fermentação submersa e em estado sólido, na literatura há poucos relatos de estudos comparativos de produção destas enzimas, quando produzidas pelos dois sistemas fermentativos. Alguns estudos sugerem que a fisiologia da produção enzimática é bastante diferente nos dois processos (MINJARES-CARRANCO et al., 1997). Os trabalhos encontrados mostram que geralmente o processo de FES proporciona maior produção das enzimas (AGUILAR et al., 2004).

SOLÍS-PEREIRA et al. (1993) compararam a produção de pectinases por *Aspergillus niger* em FSM e FES utilizando diferentes fontes de carbono, avaliando o efeito da adição de glicose, sacarose e ácido galacturônico sobre a produção enzimática. As atividades das enzimas endo-poligalacturonase e exo-poligalacturonase em FSM (0,5 U/mL

e 8,0 U/mL, respectivamente) foram inferiores às obtidas em FES (6,0 U/g e 17,0 U/g, respectivamente). Além disso, altas concentrações de glicose estimularam a produção das enzimas em FES, enquanto que em FSM levaram à repressão catabólica.

ACUÑA-ARGÜELLES et al. (1995) compararam a produção e as propriedades das pectinases produzidas por *Aspergillus niger* em FSM e FES, investigando o tempo de produção e a estabilidade das enzimas à temperatura e pH. A máxima atividade de endopoligalacturonase nos dois processos fermentativos ocorreu após 96 horas de cultivo, sendo cerca de 200 U/g em FES e 150 U/g em FSM. A produção de pectina liase em FES teve o seu pico em 48 horas (70 U/g), enquanto que em FSM (50 U/g) ocorreu após 96 horas de cultivo. Segundo os autores, as pectinases produzidas por FES apresentaram maiores termoestabilidade e estabilidade a valores extremos de pH. Em pH 9,0, a pectina liase produzida por FES manteve 50% de sua atividade original, enquanto que aquela obtida em FSM praticamente não apresentou atividade.

MALDONADO e SAAD (1998) estudaram a produção de pectinases por *Aspergillus niger* em FES e FSM. Os resultados mostraram que as atividades de pectinesterase e poligalacturonase foram, respectivamente, 4 e 6 vezes maiores em FES em relação à obtida em FSM. A produção da enzima α -frutofuranosidase por este mesmo fungo também foi cerca de 5 vezes mais elevada em FES que em FSM (ASHOKKUMAR et al., 2001).

Em um estudo de produção de pectinase por duas linhagens mutantes de *Aspergillus niger*, MINJARES-CARRANCO et al. (1997) encontraram resultados distintos com relação à produção da enzima em FES e FSM. Uma das linhagens apresentou alta produção da mesma em FES e baixa em FSM. Já para a outra linhagem estudada, a maior atividade foi obtida em FSM. Estes resultados indicam que diferentes linhagens de uma espécie microbiana podem ter adaptações diferentes para a produção de uma mesma enzima, em processos fermentativos distintos.

Estudo relatado por TARAGANO e PILOSOF (1999) mostra também que o tipo de técnica fermentativa pode influenciar de maneira distinta a produção de diferentes tipos de pectinases. Os autores observaram que a produção de poligalacturonase pelo fungo

Aspergillus niger foi 5 vezes maior em FSM que em FES, enquanto que a produção de pectina liase foi 3 vezes maior em FSM. Resultado semelhante foi relatado por PATIL e DAYANAND (2005) na produção de endo e exo-poligalacturonase por duas linhagens de *Aspergillus niger*, nas quais a produção de endo-PG foi maior em fermentação submersa e de exo-PG foi maior em fermentação em estado sólido.

5- Produção de pectinases por microrganismos termofílicos

Microrganismos que crescem em altas temperaturas podem ser classificados como termofílicos (que apresentam temperatura ótima de crescimento em cerca de 45°C) e hipertermofílicos (nos quais a temperatura ótima de crescimento fica em torno de 80°C) (MADIGAN et al., 1997). Dentre os organismos eucariotos, somente algumas espécies de fungos são termofílicas. Porém, como a termofilia nestes organismos não é tão extrema como em eubactérias ou archaeobactérias, as quais podem crescer em temperaturas de cerca de 100°C, estes não vinham recebendo merecida atenção (MAHESHWARI et al., 2000).

Microrganismos termofílicos são de grande interesse científico, principalmente em relação ao seu potencial biotecnológico, como a produção de enzimas termoestáveis (HAKI E RAKSHIT, 2003; HOLST et al., 1997; RABALHO, 2002; MARTINS et al., 2002). As enzimas produzidas por estes organismos têm sido estudadas com vistas à sua aplicação em diversos bioprocessos e, além disso, são utilizadas como modelos para estudos bioquímicos. Recentemente, muitas pesquisas têm focado a identificação de linhagens fúngicas termofílicas capazes de produzir enzimas específicas ou o estudo de suas propriedades (BRUINS et al., 2001).

A habilidade que as enzimas termofílicas e termoestáveis (termozimas) têm de atuarem sob altas temperaturas permite que os bioprocessos ocorram em temperaturas mais elevadas. Além de apresentarem maior estabilidade à temperatura, as termozimas são geralmente mais resistentes a agentes detergentes e a enzimas proteolíticas e estáveis em amplas faixas de pH, podendo ser usadas em diferentes tipos de materiais (AQUINO, 2000; BRUINS et al., 2001; LEA, 1998).

Pelo fato da pectina ser um importante constituinte da parede celular vegetal, seria esperado que as pectinases fossem comumente produzidas por fungos termofílicos, envolvidos na decomposição de material vegetal em altas temperaturas. Porém, poucas espécies de fungos termofílicos produtores destas enzimas têm sido isolados e identificados. Da mesma forma, poucas informações são encontradas a respeito de características bioquímicas e estruturais de pectinases termofílicas e termoestáveis (MAHESHWARI et al., 2000).

SATHISH-KUMAR e PALANIVELU (1998) relataram a produção de uma poligalacturonase pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, em meio líquido contendo pectina e sacarose como fontes de carbono. Segundo os autores, até então não havia relatos na literatura sobre pectinases produzidas por fungos termofílicos, o que reforça a necessidade de estudos de produção das pectinases por estes organismos. A PG obtida mostrou um pH ótimo de 5,5 e temperatura ótima de 70°C quando foi utilizado pectato de potássio como substrato do meio de reação. Já quando foi utilizada pectina, estes valores foram de 4,5 e 50°C, indicando a presença de diferentes pectinases no extrato enzimático bruto. No ano seguinte, estes autores publicaram a purificação e caracterização da poligalacturonase obtida do trabalho anterior.

MARTINS et al. (2002) investigaram a produção e caracterização das enzimas poligalacturonase e pectina liase pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*, através da fermentação em estado sólido utilizando diferentes subprodutos agro-industriais. O substrato composto por 30% de bagaço de cana-de-açúcar e 70% de bagaço de laranja proporcionou boa produção de ambas as enzimas, as quais apresentaram-se bastante termoestáveis. A atividade máxima da PG produzida ocorreu em pH 4,5 e a 65°C e a de PL ocorreu em pH 10-10,5, nesta mesma temperatura. As enzimas PG e PL mantiveram-se estáveis a 60°C durante 1 e 5 horas, respectivamente.

Na literatura há também dados sobre a produção de pectinases termoestáveis por bactérias termofílicas. SINGH et al. (1999) relataram a produção e caracterização de uma pectato liase por *Bacillus licheniformis*. A enzima apresentou pH ótimo 11,0 e temperatura

ótima de 69°C. Na temperatura de 65°C, esta manteve 100% da sua atividade original, durante 2 horas.

TAKAO et al. (2000) estudaram a produção de uma pectato liase termoestável por *Bacillus* sp. TS47 em meio contendo poligalacturonato e de uma protopectinase, em meio contendo protopectina de limão. A enzima pectato liase purificada apresentou atividade máxima em pH 8,5 e a 70°C e manteve 50% da sua atividade original a 65°C durante 13 horas e a 70°C, durante 1 hora.

5.1- Adaptações moleculares à termofilia

A temperatura é um dos principais fatores que influenciam o crescimento e a sobrevivência dos organismos. Em temperaturas elevadas, as reações químicas e enzimáticas na célula ocorrem mais rapidamente e o crescimento microbiano é conseqüentemente mais rápido e acentuado. No entanto, quando a temperatura supera aquela na qual o microrganismo tem capacidade de adaptação, as proteínas, os ácidos nucleicos e outros componentes celulares podem ser irreversivelmente danificados (MADIGAN et al., 1997).

O perfil do crescimento microbiano frente à temperatura do ambiente pode ser descrito como segue. Os microrganismos apresentam uma temperatura mínima de crescimento abaixo da qual não ocorre o seu crescimento, considerando que suas enzimas e seu sistema de transporte estão atuando aquém do necessário para sustentar a divisão celular, uma temperatura ótima na qual o crescimento microbiano é máximo e uma temperatura máxima, acima da qual o crescimento não é possível e ocorre a morte celular por colapso da membrana citoplasmática e desnaturação de proteínas e DNA. Estas temperaturas são geralmente características para cada grupo de microrganismos, mas não são completamente fixadas, uma vez que podem ser modificadas por fatores ambientais, principalmente pela composição do meio de crescimento (MADIGAN et al., 1997).

Temperaturas elevadas são encontradas na natureza somente em algumas áreas restritas como em solos completamente expostos à luz solar, onde pode chegar a 50°C e em

pilhas de material vegetal em decomposição, nas quais a temperatura geralmente atinge cerca de 60-65°C. No entanto, ambientes que apresentam as maiores temperaturas são aqueles relacionados a fenômenos vulcânicos, nos quais apenas os hipertermofílicos conseguem se desenvolver (VIEILLE e ZEIKUS, 2001).

Os organismos termofílicos e hipertermofílicos apresentam algumas adaptações que permitem seu crescimento em temperaturas elevadas. Primeiramente, suas enzimas e outras proteínas são muito mais estáveis ao calor que aquelas presentes nos organismos mesofílicos e atuam otimamente sob altas temperaturas (PELCZAR et al., 1996).

A estabilidade conformacional é resultado de um equilíbrio entre dois fatores opostos: a flexibilidade, para a função catalítica da enzima, e a rigidez, para a sua estabilidade conformacional. As termozimas são significativamente mais rígidas que enzimas mesofílicas à temperatura ambiente, sendo que esta alta rigidez protege as proteínas da desnaturação e mantém a sua estrutura cataliticamente ativa (BRUINS et al., 2001).

Alguns estudos com enzimas termofílicas têm mostrado que estas geralmente diferem muito pouco na seqüência de aminoácidos, quando comparada com as enzimas que catalisam as mesmas reações nos mesofílicos. Aparentemente, a substituição de alguns aminoácidos em um ou poucos locais das enzimas permite a estas apresentar maior termoestabilidade. Estudos com vários grupos de enzimas indicam que alguns aminoácidos, como alanina, arginina, prolina e leucina, contribuem para melhorar a eficiência de empacotamento das enzimas e para aumentar a sua rigidez (através da estabilização de α -hélices e otimização de interações) (VIEILLE e ZEIKUS, 2001). Esta semelhança na seqüência de aminoácidos foi também relatada por VIEILLE e ZEIKUS (1996). Segundo os autores, a similaridade na seqüência de aminoácidos entre uma termozima e sua similar mesofílica é de 40% a 85% e suas estruturas tridimensionais são superpostas.

A termoestabilidade pode ser também conseguida através do aumento do número de pontes dissulfeto, de ligações com sais (interações das cargas nos aminoácidos com Na^+ ou outros cátions) e pelo empacotamento altamente hidrofóbico da proteína. Além disso,

fatores extrínsecos, como a glicosilação, ajudam a estabilizar certas termozimas (SCANDURRA et al., 1998).

Além das proteínas, a membrana plasmática e a maquinaria de síntese proteica (ribossomos, RNAs e outros componentes), são também mais resistentes à temperatura (TOLNER et al., 1997). A membrana citoplasmática dos termofílicos é rica em ácidos graxos saturados, que formam um número bem mais elevado de interações hidrofóbicas que os ácidos graxos insaturados, permitindo às membranas permanecerem mais estáveis e funcionarem sob temperaturas elevadas (TOLNER et al., 1997; MADIGAN, 1997).

Nos últimos anos, houve um aumento significativo no interesse de produção de enzimas termoestáveis, devido ao grande potencial biotecnológico que apresentam. Elas têm sido usadas em biologia molecular (como a Taq polimerase), adicionadas em detergentes (proteases) e nas indústrias de processamento do amido (α -amilases, glicose-isomerases). Além disso, são potencialmente capazes de atuar em vários outros processos que requerem altas temperaturas (VIEILLE e ZEIKUS, 1996).

6- Purificação e propriedades bioquímicas de pectinases microbianas

Geralmente, a otimização de um protocolo de purificação envolve muita experimentação do tipo tentativa e erro, especialmente pelo fato de que, mesmo quando se conhecem as características físico-químicas da proteína a ser purificada, muitas vezes é imprevisível o seu comportamento no decorrer do processo de purificação. O grande desafio destes processos é o trabalho para se encontrar as melhores estratégias e, se for o caso, adequar a metodologia para a escala de produção pretendida, garantindo que o produto final tenha todas as características necessárias para a sua aplicação (ALMEIDA e KURTENBACH, 2002).

O requerimento inicial para a purificação de uma proteína é a liberação e/ou obtenção da mesma de sua fonte natural, como os tecidos vegetais e os microrganismos. No caso das enzimas microbianas, o conjunto de enzimas liberadas da fonte natural (extrato bruto) pode ser facilmente obtido já que estas podem ser secretadas para o meio de cultura. Este é um sistema cada vez mais usado para a obtenção de grandes quantidades de

proteínas já em solução aquosa. O passo seguinte consiste na clarificação da amostra, sendo que esta etapa representa um grande problema, especialmente em purificações de grande escala ou em escala industrial. Na maioria das vezes, são utilizadas técnicas de centrifugação ou de filtração para clarificar o extrato enzimático bruto (HO et al., 2001; PESSOA e KILIKIAN, 2005).

O prosseguimento ao processo deve ser feito após um planejamento da estratégia a ser utilizada, na qual, além da estabilidade da proteína, deve-se também considerar os seguintes itens (HO et al., 2000): a eficiência do processo (geralmente expresso em termos de enriquecimento e recuperação da proteína), viabilidade econômica (levando-se em conta o gasto envolvido em cada técnica) e tipo de aplicação final do produto.

O esquema ideal de purificação depende não apenas das características da proteína de interesse, mas também das características dos contaminantes presentes no extrato bruto. A linha geral a ser seguida pode ser dividida em três fases principais: (DEUTSCHER, 1990): os primeiros passos são geralmente aqueles que apresentam um menor poder de resolução, mas que permitem o tratamento de grande quantidade de material, como a diálise ou a precipitação. Numa segunda fase da purificação, são exploradas diferentes características físico-químicas das proteínas, com o uso de diferentes técnicas de cromatografia em coluna, que são classificadas de acordo com a característica da proteína que as mesmas selecionam (Tab. 1). A filtração em gel e a troca iônica são os sistemas mais utilizados para a distinção entre proteínas (DEUTSCHER, 1990).

Tabela 1: Cromatografias utilizadas na purificação de proteínas e suas características.

Tipo de cromatografia	Característica da proteína	Condição inicial da amostra	Eluentes	Custo
Filtração em gel	Massa molar	Volume ? 5% do volume da coluna	Qualquer solução aquosa	+
Troca Iônica	Carga elétrica	Baixa concentração iônica	Soluções salinas ou com pH distintos da condição inicial	++
Interação Hidrofóbica	Hidrofobicidade	Alta concentração de sal	Soluções com baixa concentração salina	++
Fase Reversa	Hidrofobicidade	Sem altas concentrações de sais	Solvente orgânico	+++
Afinidade	Especificidade a ligantes	Condições específicas para ligação	Alta concentração de ligantes ou sais	+++

Durante a purificação, é aconselhável a escolha de técnicas que explorem sequencialmente diferentes propriedades físico-químicas das proteínas (PESSOA-JÚNIOR e KILIKIAN, 2005). Além disso, a atividade da proteína de interesse, bem como a quantidade de proteínas totais, devem ser acompanhadas em todos os passos a fim de se avaliar a eficiência do processo. O conteúdo protéico de todas as etapas pode ser avaliado por eletroforese unidimensional ou bidimensional em gel de poliacrilamida, para verificar se a amostra se encontra no grau de pureza desejado ou se novos passos de purificação serão necessários (ALMEIDA e KURTENBACH, 2002).

Para se atestar a pureza final da proteína, podem ser usadas várias técnicas que apresentem sensibilidades distintas, sendo a mais comum é a eletroforese em gel de poliacrilamida. Além disso, a pureza da amostra pode ser indicada com grande confiabilidade por algum tipo de cromatografia em coluna quando realizado em sistemas de HPLC, que dispõem de detectores altamente sensíveis, que determinam a absorvidade do eluído da coluna em todo espectro de luz visível e ultravioleta.

A fase final de um processo de purificação requer passos que retirem contaminantes que ainda possam estar presentes na amostra, como a liofilização (que permite a retirada de contaminantes voláteis, sob baixas pressões), diálise (para excluir sais ou outras moléculas não voláteis da solução protéica) ou ultrafiltração (ALMEIDA e KURTENBACH, 2002).

Para pesquisas relacionadas ao modo de ação e para uma aplicação industrial mais eficiente das pectinases, a purificação e o avanço do conhecimento sobre suas propriedades bioquímicas são essenciais. Na literatura, são encontrados muitos trabalhos sobre produção e aplicações biotecnológicas destas enzimas. Por outro lado, são escassos trabalhos relacionados à purificação e propriedades bioquímicas de pectinases purificadas, principalmente de termofílicos (GUMMADI e PANDA, 2003).

DEVI e RAO (1996) purificaram e caracterizaram 3 poligalacturonases (PG I, PG II e PG III) produzidas por *Aspergillus carbonarius* em fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato. As enzimas foram purificadas através da aplicação em gel filtração em resina Sephacryl S-200, seguida de cromatografia de troca iônica em CM Sephadex e gel filtração em Sephadex G-50. Os valores de pH ótimo para atividade das mesmas foram de 4,0, 4,1 e 4,3 para a PG I, PG II e PG III, respectivamente. As maiores atividades foram a 55°C, 50°C e 55°C para PG I, PG II e PG III, respectivamente. Os autores também investigaram a termoestabilidade das enzimas e observaram que a PG I e a PG II apresentaram um perfil de inativação térmica semelhante, mantendo 50% da atividade original a 43°C e 46°C, respectivamente. Já a PG III mostrou-se um pouco mais estável. A 54°C, esta manteve 50% de sua atividade original, porém a 60°C manteve apenas cerca de 5%. Pela análise da composição dos aminoácidos presentes em cada enzima, foi encontrado que a PG III possui um conteúdo maior de Arginina, o que pode ter contribuído para a maior termoestabilidade da mesma.

MACEIRA et al. (1997) purificaram (em coluna de cromatografia de troca iônica contendo resina DEAE-Sepharose) uma exo-poligalacturonase produzida por uma linhagem de *Fusarium oxysporum* em fermentação submersa, em meio sintético suplementado com 1% de ácido poligalacturônico. A enzima apresentou massa molar de 63 kDa e manteve de 70% a 100% a atividade original na faixa de pH entre 3,5 e 9,0. De acordo com os autores,

esta alta estabilidade não havia sido ainda relatada anteriormente na literatura para outras poligalacturonases. A temperatura ótima para sua atividade foi de 55°C. Foi investigado também o efeito de vários íons sobre a atividade daquela enzima, sendo que nenhum deles a ativou. Por outro lado, significativa inibição da atividade foi observada para vários íons. A adição de Cu^{+2} , Zn^{+2} , Co^{-2} , Mg^{+2} e Ca^{+2} inibiu a atividade enzimática em 48 a 58%, enquanto que os íons Hg^{+2} e Fe^{+3} inibiram em 31% e 25%, respectivamente.

ISSHIKI et al. (2000) relataram a purificação de uma exo-poligalacturonase produzida pelo fungo *Venturia naschicola* e 3 endopoligalacturonases produzidas por *Venturia pirina* em fermentação submersa, em meio Czapek contendo pectina a 1% como fonte de carbono. As enzimas foram purificadas através da aplicação em coluna de cromatografia de troca iônica contendo resina CM-Sepharose e posteriormente em HPLC. A massa molar das mesmas foi de 43 kDa para a exo-PG e 42 kDa para todas as endopoligalacturonases. O pH ótimo da exo-PG foi 5,0 e o das endopoligalacturonases não foi determinado.

RHA et al. (2001) estudaram a expressão de duas exo-poligalacturonases (PG I e PG II) produzidas pelo fungo *Botrytis cinerea* em meio líquido contendo pectina de citrus, ácido poligalacturônico, ácido galacturônico ou sacarose a 0,5% como fonte de carbono. A PG II foi purificada e apresentou massa molar de 66 KDa.

BARENSE et al. (2001) purificaram parcialmente duas exo-PGs do fungo *Penicillium frequentans*, produzidas em fermentação submersa. A exo-PG I apresentou massa molar de 63 kDa e pH ótimo de 5,0, enquanto a exo-PG II apresentou massa molar de 79 kDa e pH ótimo de 5,8. A temperatura ótima de ambas as enzimas foi de 50°C.

CHELLEGATTI et al. (2002) relataram a purificação e caracterização de uma exo-PG, também produzida pelo fungo *Penicillium frequentans*. A enzima apresentou massa molar de 74 kDa, pH ótimo de 3,9 e temperatura ótima de 50°C. De acordo com os autores, estes valores estão próximos aos observados para PGs de outros fungos mesofílicos, os quais geralmente têm pH ótimo entre 4,0 e 7,0 e temperatura ótima entre 35°C e 50°C. Neste trabalho, foram fracionados 6 tipos de pectinases. De acordo com os autores, a produção de múltiplas formas de exo-PGs pode ser causada pela presença de múltiplos genes codificadores destas enzimas e/ou a modificações pós-tradução de um único produto

gênico. Esta capacidade de produzir isoformas com características diferentes pode, segundo os autores, ser uma vantagem para o crescimento do fungo na natureza, onde os substratos disponíveis também podem ser variados.

PASHKOULOV et al. (2002) caracterizaram as poligalacturonases produzidas por cinco linhagens diferentes de *Botrytis cinerea* por fermentação submersa em meio Czapek contendo 1% de pectina. Foi observado que a massa molar das enzimas obtidas pelas diferentes linhagens ficou entre 32 kDa e 45 kDa.

SAKAMOTO et al. (2002) purificaram duas exo-PGs de *Aspergillus niger*, por cromatografia em coluna Mono Q HR 5/5, em coluna HioLoad 16/60 Superdex 75 e em coluna Superose 12 HR 10/30 (Amershan Pharmacia). Foi observado que as duas enzimas mostraram-se diferentes em termos de massa molar, de estabilidade à temperatura e pH e ao efeito do íon Hg^{+2} . O pH ótimo das enzimas ficou entre 3,4 e 3,8 para a PG I e 3,4 e 4,2 para a PG II. Ambas apresentaram temperatura ótima de atuação a 60°C. Quanto à estabilidade ao pH, a PG I manteve mais de 70% da atividade original após 5 horas de incubação na faixa de pH entre 2,8 a 6,3, enquanto que a PG II manteve esta estabilidade somente entre os valores de pH entre 2,8 a 4,8. Em relação à termoestabilidade, a PG I preservou cerca de 75% da atividade original, quando incubada por 30 minutos a 60°C. Já a PG II preservou apenas 25% da sua atividade. A 70°C, ambas foram totalmente inibidas. A adição de Hg^{+2} a 0,01 mM aumentou 3,4 vezes a atividade da PG I, enquanto que para a PG I não acarretou alteração.

MOHAMED et al. (2003) estudaram a produção, purificação e caracterização de duas poligalacturonases produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei*, em fermentação submersa. As enzimas foram purificadas através de sua aplicação em diferentes colunas, como DEAE-Sepharose CL-6B, Hiprep 16/60 Sephacryl S200 HR, Hitrap SP-Sepharose Amershan BioScience e Superdex 75 HR 10/30 (Amershan BioScience). As massas molares das enzimas PG I e PG II foram de 66 kDa e 63 kDa, respectivamente. O pH ótimo das enzimas foi de 4,5 e 4,2 e as atividades decresceram em valores de pH superiores a 3,5 e 5,0, respectivamente. A temperatura ótima da PG I foi de 40°C e da PG II foi 50°C. Quando incubadas a 60°C durante 15 minutos, a PG I manteve cerca de 10% de atividade,

enquanto que a PG II ainda preservou cerca de 80%. Já a 80°C, ambas foram quase totalmente inibidas.

NITURE e PANT (2004) purificaram e caracterizaram um poligalacturonase do fungo *Fusarium moliniforme*, produzida por FES utilizando farelo de trigo e bagaço de laranja como substrato. Após 4 etapas, o fator de purificação foi de 14,66 e o rendimento foi de 0,15%. A enzima purificada apresentou pH ótimo de 5,3 e temperatura ótima de 40°C. Sua massa molar foi determinada por eletroforese em 30,6 kDa e o ponto isoelétrico foi de 8,6.

SAITO et al. (2004) relataram a purificação de uma PG produzida pelo fungo *Rhizopus oryzae* por FES utilizando bagaço de laranja. Após 2 etapas de purificação, o fator de purificação foi de 188 vezes, com rendimento final de 41,1%. A enzima mostrou pH ótimo de 4,5, temperatura ótima de 45°C e uma massa molar de cerca de 31,0 kDa. A mesma foi determinada como sendo uma endopoligalacturonase, pela formação de oligogalacturonídeos como produtos de hidrólise.

Nos últimos anos, alguns trabalhos de purificação de pectinases por fungos termofílicos têm sido descritos.

SATHISH-KUMAR e PALANIVELU (1999) purificaram uma exopoligalacturonase produzida pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* em meio líquido contendo 1% de pectina e 1% de sacarose como fontes de carbono. A purificação foi feita em cromatografia de troca iônica com resina DEAE-Sepharose. A enzima purificada apresentou um pH ótimo de 5,5 e temperatura ótima de 60°C, mostrou-se completamente estável à temperatura ambiente ($32 \pm 3^\circ\text{C}$) e reteve cerca de 50% de atividade a 50°C, durante 6 horas. A 60°C, somente 4% da atividade foram mantidos após 1 hora de incubação. A mesma apresentou uma massa molar de 59 kDa. Segundo os autores, a massa molar de poligalacturonases produzidas por diferentes microrganismos geralmente encontra-se na faixa entre 40 a 65 kDa e a maioria é ativa em pH ácido. Neste trabalho também foi analisado o efeito de íons sobre a atividade da enzima purificada. Foi observado que os íons Mg^{+2} e Mo^{+2} aumentaram em cerca de 10% a atividade, enquanto

que Li^+ , K^+ e Na^+ não exerceram efeito significativo. Já em alta concentração (10 mM) de íons Fe^{+3} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} e Ca^{+2} , a atividade foi quase totalmente inibida.

KAUR et al. (2004) relataram a purificação parcial e caracterização de uma poligalacturonase termoestável produzida pelo fungo termofílico *Sporotrichum thermophile* em fermentação submersa. A enzima mostrou pH ótimo de 7,0 e temperatura ótima de 55°C. A mesma aumentou sua atividade na presença de íons Mn^{+2} (1 mM) em cerca de 36% e Fe^{+2} (5 mM) em 58%. Em presença de Mg^{+2} (a 1 mM), a atividade caiu para cerca de 23%.

CELESTINO et al. (2005) purificaram e caracterizaram uma pectinase do fungo termofílico *Acrophialophora nainiana*, a qual apresentou atividade de exo-PG e pectinase, pH ótimo 8,0, temperatura ótima de 60°C e massa molar de 35,5 kDa.

Algumas poligalacturonases bacterianas também têm sido purificadas.

KAPOOR et al (2000) relataram a purificação parcial e a caracterização bioquímica de uma exopoligalacturonase alcalina produzida pela linhagem *Bacillus* sp. MG-cp-2. A purificação parcial foi feita através da precipitação em sulfato de amônio e posterior diálise e concentração da enzima. Esta apresentou temperatura ótima de 60°C e manteve 100% da atividade original a 50°C, por mais de 12 horas e 50% da atividade por 120, 118 e 20 minutos a 60°C, 70°C e 80°C, respectivamente. Além disso, reteve cerca de 80% da sua atividade em uma ampla faixa de pH alcalino (7,0 a 12,0), por mais de 24 horas. A enzima foi estimulada pela adição de íons como Ca^{+2} e Li^{+2} e inibida pela adição de Hg^{+2} .

KOBAYASHI et al (2000) relataram a purificação e caracterização de uma exopoligalacturonase alcalina produzida por uma linhagem de *Bacillus*. A mesma foi purificada através da aplicação em coluna SuperQ-Toyopearl 650M (Tohso) e em DEAE-Bio-Gel A (Bio-Rad). De acordo com os autores, a enzima purificada apresentava a maior massa molar até então relatada para as pectinases de diferentes origens (115 kDa). Outra característica observada, a qual difere da maioria das pectinases relatadas, foi o pH ótimo de atividade (8,0), mais elevado que o da maioria das pectinases bacterianas, que

geralmente está na faixa entre 4,0 e 5,5 (ROMBOUTS e PILNIK, 1980; RIOU et al., 1992; MACEIRA et al., 1997). Além disso, a enzima mostrou-se bastante estável na faixa de pH entre 6,0 e 12,0, quando incubada por 1 hora em cada pH avaliado. A temperatura ótima encontrada foi de 50°C. Foi analisado também o efeito de vários íons sobre a sua atividade. Os íons Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} , Pd^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+3} e Sr^{+2} aumentaram a atividade em 60%, 36%, 31%, 18%, 16% e 15%, respectivamente. Por outro lado, os íons Zn^{+2} , Cu^{+2} e Ni^{+2} inibiram em 6%, 31% e 72%, respectivamente.

IV- OBJETIVOS

1- GERAL

Purificar as poligalacturonases produzidas pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* em fermentação submersa e em fermentação em estado sólido e caracterizar as enzimas, sob o ponto de vista comparativo.

2- ESPECÍFICOS

2.1- Determinar o substrato e o tempo de cultivo mais apropriado para a produção de poligalacturonase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* em fermentação submersa, dentre meios com pectina comercial e com sub-produtos agro-industriais, como fonte de carbono.

2.2- Avaliar a influência de diferentes valores de pH inicial do meio de cultivo (4,5, 5,0 e 5,5), e da temperatura de fermentação (45°C e 50°C), sobre a produção da enzima em FSM.

2.3- Produzir a poligalacturonase em FES utilizando como substrato bagaço de cana-de-açúcar e bagaço de laranja na proporção de 30%/70% (p/p), conforme protocolo já estabelecido em trabalho anterior.

2.4- Caracterizar, sob o ponto de vista comparativo, as enzimas brutas obtidas por fermentação submersa e em estado sólido, quanto ao pH e temperatura ótimos de atividade e quanto à estabilidade frente a variações de pH e temperatura.

2.5- Purificar as poligalacturonases produzidas pelo fungo termofílico *T. aurantiacus* nos dois processos fermentativos.

2.6- Caracterizar, sob o ponto de vista comparativo, as enzimas obtidas pelos dois processos fermentativos, após purificadas, quanto:

2.6.1- Ao pH e temperatura ótimos de atividade e quanto à estabilidade frente a variações de pH e temperatura.

2.6.2- A especificidade ao substrato

2.6.3- A influência de íons metálicos nas suas atividades

2.6.4- A características cinéticas (K_m e $V_{m\acute{a}x}$)

2.6.5- Aos pontos isoeletricos

2.6.6- Aos modos de ação, pela análise dos produtos de hidrólise.

V- MATERIAL E MÉTODOS

1- Microrganismo

Foi utilizado o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* 179-5, isolado a partir de amostra de serrapilheira e selecionado em trabalhos anteriores como bom produtor de xilanase, celulase, amilase e pectinase (MARTINS, 2003). O fungo foi identificado no Laboratório de Micologia do Instituto de Botânica de São Paulo.

2- Meios de cultivo

2.1- Meio de manutenção

O fungo foi mantido em meio Sabouraud, a 7°C em geladeira, sob óleo mineral e em tubos criogênicos a -20°C, em meio contendo glicerol a 20%.

2.2- Meio para a fermentação submersa e obtenção da enzima

Foram testados meios de cultivo contendo pectina comercial (Braspectina) e também meios alternativos, contendo subprodutos agro-industriais como fonte de carbono. Os experimentos foram feitos em três repetições e os resultados estão expressos em valores da média obtida nos mesmos.

2.2.1- Escolha do meio basal

Para a avaliação do meio de cultivo mais apropriado para a produção da enzima, inicialmente foram utilizados meios de cultivo contendo pectina comercial (Sigma) como

fonte de carbono, com o pH inicial ajustado (com NaOH 0,5 M) para 5,5. Estes foram testados com a pectina esterilizada junto ao meio e também com a pectina esterilizada separadamente, uma vez que o nível de açúcar redutor inicial do meio de cultivo variou nestas duas condições. Os meios de cultivo contendo pectina comercial como fonte de carbono foram:

Meio Czapek (WISEMAN, 1975):

NaNO ₃	0,3%
KH ₂ PO ₄	0,1%
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05%
KCl.....	0,05%
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,001%
Pectina	2,0%

Meio Khanna (KHANNA et al., 1995):

Solução de sais 20x?

NH ₄ NO ₃	2,0%
KH ₂ PO ₄	1,3%
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,362%
KCl.....	0,098%
MnSO ₄ .H ₂ O.....	0,0138%
ZnSO ₄ .H ₂ O.....	0,007%
Fe ₂ (SO ₄) ₃ .6H ₂ O.....	0,0066%
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0062%

Preparação do meio:

Solução de sais 20x?.....	5,0%
Extrato de levedura	0,1%
Pectina	2,0%

Meio SR (RIZZATTI et al., 2001):

Solução de sais 20x?

KH ₂ PO ₄	0,3%
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,24%
NH ₄ H ₂ PO ₄	1,0%

Preparação do meio:

Solução de sais 20x?.....	5,0%
Peptona.....	0,02%
Extrato de levedura.....	0,45%
Pectina.....	2,0%

Meio Vogel (VOGEL, 1964):

Solução de sais 50x?

Citrato de Sódio.5H ₂ O.....	5,0%
NH ₄ NO ₃	10,0%
KH ₂ PO ₄	25,0%
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1,0%
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,5%
Pectina.....	2,0%
Solução de traços de elementos.....	0,5%

A solução de traços de elementos foi composta por:

ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	2,2%
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	0,5%
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5%
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,16%
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O.....	0,11%
NaEDTA.....	5,0%

2.2.2- Estudo de fontes de carbono alternativas

Após a escolha do meio de cultivo basal (com pectina comercial como fonte de carbono) mais apropriado para a produção de PG, foram utilizados meios de cultivo contendo subprodutos agrícolas e agro-industriais em substituição à pectina comercial. Esta análise teve o intuito de verificar a possibilidade de se utilizar substratos alternativos para a produção da enzima, uma vez que isto pode representar um menor custo de produção.

Foram testados os seguintes substratos alternativos: bagaço de laranja, casca de maracujá e farelo de trigo (todos a 2%) e também o resíduo do processamento de suco de laranja (água amarela). Todos os meios tiveram o pH inicial corrigido (com NaOH 0,5 M) para 5,5.

O bagaço de laranja industrializado foi fornecido pela Citrovita S/A de Catanduva-SP e o farelo de trigo foi adquirido no comércio local. A casca de maracujá, também obtida no comércio local, foi seca a 70°C e triturada. A água amarela, um resíduo do processamento do suco de laranja fornecido pela Bascitrus de Mirassol-SP, foi testada sem diluição e também diluída 5 vezes e 10 vezes, visando-se diminuir o nível de açúcar redutor inicial da mesma e investigar o efeito deste fator no crescimento do fungo e na atividade enzimática.

2.2.3- Fermentação e obtenção da enzima

Um volume de 25 mL de meio foi inoculado com 2,0 mL de suspensão micelial (aproximadamente 0,6 mg de micélio seco por mL de meio).

O cultivo foi feito durante 8 dias sob agitação a 110 rpm e, a cada 24 horas, foi coletada uma amostra de cada tratamento, correspondente a um Erlenmeyer. O material retirado foi filtrado a vácuo e centrifugado a 10000 g durante 10 minutos a 10°C e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

Em cada amostra retirada, foram determinados a atividade enzimática, a biomassa microbiana (expressa em peso seco), o nível de açúcar redutor do meio (expresso em mg de ácido galacturônico por mL, utilizando-se curva padrão de ácido galacturônico) e o pH do meio de cultivo ao longo do processo fermentativo.

Estas determinações tiveram o intuito de avaliar se a produção enzimática relaciona-se com a fase de maior crescimento do fungo e com os níveis de açúcares redutores iniciais. Além disso, a medida do pH visou avaliar se há grandes variações deste fator ao longo do processo fermentativo.

3- Planejamento experimental para o estudo dos fatores pH inicial do meio de cultivo e temperatura de fermentação

Após a escolha do meio de cultivo mais apropriado para a produção de poligalacturonase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* por fermentação submersa, foi estudada a influência do pH inicial do meio e da temperatura de fermentação, sobre a produção da enzima. Foram avaliadas as temperaturas de incubação de 45°C e 50°C e os valores de pH de 4,5, 5,0, e 5,5, segundo um planejamento experimental de 3 x 2. O pH dos meios foi corrigido com NaOH 0,5 M. Os tratamentos realizados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Tratamentos aplicados no experimento fatorial 3 x 2.

pH inicial do meio	Temperatura de incubação (°C)
4,5	45
	50
5,0	45
	50
5,5	45
	50

4- Meio para a fermentação em estado sólido e obtenção da enzima

Foi utilizado como substrato para a fermentação uma mistura de 30% de bagaço de cana-de-açúcar, fornecido pela Usina de Açúcar e Álcool São Domingos de Catanduva-SP e 70% de bagaço de laranja industrializado, fornecido pela Citrovita S/A de Catanduva-SP.

O bagaço de cana foi lavado com água corrente, seco a 60°C, moído e peneirado usando peneira para seleção de partículas de 0,5 mm. Este foi misturado ao bagaço de laranja também seco em estufa a 60°C e moído, na proporção de 30%/70% (p/p). Os materiais, misturados e homogeneizados, foram esterilizados em autoclave a 120°C por 30 minutos.

A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 5 g de substrato esterilizado (120° C/40 min). O material foi inoculado com 5 mL de suspensão micelial (aproximadamente 14,5 mg de micélio seco / g de meio), obtida através da suspensão da cultura de 4 dias em meio Sabouraud, em água estéril.

Após a inoculação, 7 mL de solução nutriente, composta por 0,1% de NH_4NO_3 , 0,1% de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com pH 5,0, foram adicionados em cada frasco (umidade inicial de 70%). O cultivo foi feito a 50°C, durante 4 dias. Após este intervalo, os frascos foram retirados e nestes foram adicionados 40 mL de água destilada, sendo posteriormente agitados por 40 minutos em “shaker” a 100 rpm. O material foi filtrado e centrifugado a 1000 g durante 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

Estas condições fermentativas foram definidas em trabalho prévio (MARTINS, 2003).

5- Medida da atividade enzimática

A atividade de exo-poligalacturonase foi determinada em 0,4 mL de tampão acetato-NaOH 0,2 M pH 5,0, contendo 1% de pectina de baixa esterificação (Sigma) e 0,1 mL de solução enzimática bruta. O açúcar redutor liberado (ácido D-galacturônico), após a incubação da mistura reacional a 60°C por 10 min, foi quantificado pelo método do DNS, proposto por MILLER (1959). Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácido galacturônico por minuto, nas condições de reação, utilizando curva padrão de ácido galacturônico.

A atividade de endo-poligalacturonase foi determinada viscosimetricamente pela adição de 2 mL de enzima em 6 mL de tampão acetato-NaOH 0,2M pH 5,5, contendo 3% de pectina de citrus de baixa esterificação (Sigma). A mistura de reação foi incubada a 65°C por 15 minutos e a reação foi paralisada pela adição da mistura de reação em banho de gelo,

por 10 minutos. A medida da viscosidade foi feita utilizando o viscosímetro Basic (Fungilab). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que reduz a viscosidade inicial do substrato em 50%. A determinação da atividade de endo-PG foi determinada apenas para as enzimas purificadas.

6- Caracterização físico-química das pectinases

6.1- Determinação do efeito do pH e da temperatura sobre a atividade das enzimas

O comportamento das atividades das enzimas em função do pH do meio de reação foi estudado incubando-se 0,2 mL de solução enzimática e 0,4 mL de substrato em tampões acetato (pH 3,0 a 5,5), citrato-fosfato (pH 6,0 a 7,0), tris-HCl (pH 7,5 a 8,5) e glicina-NaOH (pH 9,0 a 11,0), contendo pectina de alta esterificação (a 2%) como substrato.

O efeito da temperatura sobre as atividades enzimáticas foi avaliado incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 40 a 80°C, durante 10 minutos, em pH determinado como ótimo.

6.2- Determinação da estabilidade térmica e estabilidade frente às variações de pH

Para determinar a estabilidade térmica da enzima, as soluções enzimáticas foram mantidas por uma hora, em ausência de substrato, em temperaturas de 10 a 90°C. Após esse período, foram tomadas amostras para ensaiar a atividade enzimática, nas condições de pH e temperaturas ótimos.

A estabilidade ao pH foi avaliada incubando-se as soluções em tampões acetato (pH 3,0 a 5,5), citrato-fosfato (pH 6,0 a 7,0), tris-HCl (pH 7,5 a 8,5) e glicina-NaOH (pH 9,0 a 11,0) sem pectina, durante 24 horas. Após esse período, foram tomadas amostras para medir a atividade enzimática, nas condições de pH e temperaturas ótimos, de acordo com o item 5.

A estabilidade da enzima também foi expressa em atividade residual (% da atividade original obtida no pH e temperatura ótimos).

7- Protocolo de purificação das enzimas

Para purificação das enzimas, foram feitos testes preliminares para determinar o protocolo a ser seguido para cada uma. Após a determinação do mesmo, os experimentos foram feitos em três repetições, visando avaliar a reprodutibilidade dos resultados e também conseguir boa quantidade de enzima para os estudos posteriores.

7.1- Diálise e Concentração

Um volume de 150 mL de extrato bruto enzimático obtido da FSM foi dialisado em tampão acetato-NaOH 10 mM pH 5,0, “overnight”, e posteriormente liofilizado. Após a liofilização, o material foi ressuscitado em 10 mL de tampão acetato-NaOH 20mM, pH 5,0.

Para a enzima obtida da FES, um volume de 150 mL de extrato bruto enzimático foi dialisado em tampão acetato-NaOH 10 mM, pH 4,0, overnight. Após a diálise, o mesmo foi liofilizado e posteriormente ressuscitado em 20 mL de tampão acetato-NaOH 20mM, no mesmo pH. Vale ressaltar que o extrato bruto proveniente da FES contém uma grande quantidade de proteína e pigmentos. Sendo assim, foi necessária uma ressuspensão deste material em uma maior quantidade de tampão, para que sua viscosidade não interferisse nos processos cromatográficos.

7.2- Aplicação na filtração em gel

Para a aplicação de ambas as enzimas, foi utilizada a coluna Sephadex G-75 (90,0 cm x 2,5 cm – Pharmacia). Para eluição, foi usado tampão acetato-NaOH 20mM, pH 5,0 (para a da FSM) e o mesmo tampão com pH 4,0 (para a da FES). O fluxo foi fixado em 0,28 mL/min, sendo coletados 4,2 mL por tubo.

Nos tubos coletados foram determinados a atividade de PG e o teor de proteínas totais. As frações contendo o pico de atividade enzimática foram então juntadas.

7.3- Aplicação na troca iônica

Para a aplicação de ambas as enzimas, foi utilizada a coluna SP Sepharose (20,0 cm x 2,5 cm – Aldrich). Para eluição, também foi usado tampão acetato-NaOH 20mM, pH 5,0

(para a da FSM) e o mesmo tampão com pH 4,0 (para a da FES). O fluxo também foi fixado em 0,28 mL/min, sendo coletados 4,2 mL por tubo. O gradiente salino foi feito de 0 a 1,1M de NaCl.

Nos tubos coletados também foram determinados a atividade de PG e o teor de proteínas totais. Para verificação do grau de pureza, uma alíquota de cada tubo foi retirada para fazer a eletroforese. Após verificação da homogeneidade, foram juntados os tubos nos quais a enzima estava pura. Nas frações juntadas foram determinados a atividade enzimática e o teor de proteína total.

8- Eletroforese em PAGE-SDS para avaliação da pureza das enzimas e determinação da massa molar

Foi utilizado para eletroforese gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 5%, conforme metodologia descrita por LAEMMLI (1970).

O gel de separação foi composto por 1,9 mL de água deionizada, 1,7 mL de solução contendo 30% de acrilamida e 0,8% de NN-metileno-bisacrilamida, 1,3 mL de tampão TRIS-HCl 1,5 M, pH 8,8, 50 μ L de SDS 10%, 50 μ L de solução de persulfato de amônio a 0,2% e 3,0 μ L de temed. A mistura foi vertida na placa e após a polimerização, foi adicionada a mistura para o gel de empilhamento, constituída por 2,1 mL de água deionizada, 0,5 mL de solução contendo 30% de acrilamida e 1,6 % de NN-metileno-bisacrilamida, 0,38 mL de tampão TRIS-HCL 1,0 M, pH 6,8, 30,0 μ L de SDS 10%, 30,0 μ L de solução de persulfato de amônio a 0,2% e 3 μ L de temed.

As proteínas submetidas à eletroforese foram aquecidas em ebulição por 3 minutos. Foi utilizado para a corrida tampão TRIS-Glicina 0,25 M, pH 8,3, com 0,1% de SDS. O gel foi submetido a corrente elétrica de 160V e 30 mA, até o final da corrida., a 25°C. Após a corrida, o gel foi fixado com uma mistura de 12,0% de ácido acético e 50,0% de etanol por 30 min., seguindo-se a coloração com prata, a qual foi feita como descrito a seguir: O gel fixado foi submetido à redução com solução de tiosulfato de sódio a 0,02% por 1 min. Após 3 lavagens com água deionizada por 10 min, o gel foi mantido em solução de nitrato de prata a 0,2% por 14 min. As bandas foram reveladas com solução de carbonato de sódio

a 4,0%, contendo 25 µL de formaldeído. A reação com o revelador foi interrompida por adição de ácido acético a 1%, por 5 minutos.

As massas molares das enzimas foram determinadas através de reta padrão obtida por inserção em gráfico, do logaritmo das massas molares das proteínas padrões contra suas mobilidades relativas e posterior regressão linear.

9- Caracterização físico-química das poligalacturonases puras

Os procedimentos utilizados para a caracterização das poligalacturonases puras foram os mesmos descritos para a caracterização dos extratos brutos (item 6), exceto que o substrato utilizado foi pectina de baixa esterificação. A determinação da termoestabilidade a 60°C das enzimas puras foi feita incubando-as a 60°C, retirando-se amostras de 5 em 5 minutos, durante 1 hora..

10- Avaliação da especificidade ao substrato das poligalacturonases puras

Para determinar a especificidade ao substrato, foi utilizado tampão acetato-NaOH 0,2M contendo um dos seguintes substratos: ácido poligalacturônico, pectina de citrus com 26% de esterificação, pectina de citrus com 92% de esterificação ou pectina de maçã (todos a 2%). A reação foi feita nas condições ótimas de atividade de cada enzima.

11- Determinação do efeito de íons metálicos sobre a atividade das enzimas purificadas

O efeito de vários íons metálicos na atividade das PGs foi determinado pela incubação da enzima em solução de diferentes íons (Fe^{+3} , Ag^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , K^+ e Hg^{+2}) e também com EDTA, todos na concentração final de 2 mM. Após 10 minutos de incubação a 4 °C, a atividade residual da enzima foi medida.

12- Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

As constantes cinéticas foram determinadas conforme procedimento gráfico proposto por LINEWEAVER e BURK (1934), utilizando o programa GRAFIT-5.

13- Focalização isoeletrica e determinação do ponto isoeletrico

A focalização isoeletrica foi realizada utilizando o sistema de focalização isoeletrica Ettan IPGphor II (Amershan) em gel de 7.5% de poliacrilamida (14 x 15 cm) contendo anfólitos (Pharmalyte - pH 3.0-10.0), seguindo as instruções do fabricante. As bandas do gel foram visualizadas após coloração com nitrato de prata.

14- Identificação dos produtos de hidrólise

Para a análise dos produtos de hidrólise, 0,1 mL de enzima foi adicionado a 0,4 mL de solução contendo 1,0% de pectina de baixa esterificação (Sigma). A hidrólise ocorreu a 65°C por 20 minutos. Após esse período, as enzimas foram inativadas por ebulição, durante 10 minutos. A identificação dos produtos de hidrólise foi realizada pelo método de cromatografia de papel (Whatman nº 1) descendente, usando como solvente de corrida uma mistura de n-butanol, ácido acético e água, na proporção de 5:3:2, respectivamente e como solvente de revelação acetona e nitrato de prata (até a saturação), lavando com hidróxido de prata alcoólico para visualização das manchas. Os ácidos mono, di e tri-galacturônico (Sigma) foram usados como padrões. Foi feita também uma cromatografia para analisar os produtos de hidrólise liberados pela ação das enzimas no ácido trigalacturônico. Neste caso, 0,1 mL de cada enzima foi adicionado a 0,4 mL de solução contendo 1,0% de ácido trigalacturônico (Sigma), seguindo o mesmo protocolo descrito acima para a identificação dos produtos de hidrólise da pectina.

15- Medida de proteínas totais

A determinação da quantidade de proteínas totais foi feita pelo método de BRADFORD (1976), utilizando curva padrão de soroalbumina.

VI- RESULTADOS E DISCUSSÃO

1- Produção de poligalacturonase em fermentação submersa, utilizando pectina comercial como fonte de carbono

Nos primeiros testes de produção de poligalacturonase em fermentação submersa, o experimento foi feito utilizando pectina comercial como fonte de carbono, sendo que esta foi esterilizada junto com o meio nutriente basal e também separada deste. Nestes ensaios, também foram determinados, em cada amostra, o nível de açúcar redutor do meio de cultivo, a biomassa fúngica (expressa em peso seco) e o pH do meio de cultivo, ao longo do processo fermentativo.

Quando os experimentos foram feitos com a pectina esterilizada junto com o meio de cultivo, pode-se observar, através da figura 3, que não foi detectada atividade da enzima no 1^o dia fermentação. Esta foi detectada após o 2^o dia de fermentação, aumentando após este período e a maior atividade foi obtida no meio SR (1,2 (U/mL), após 5 dias de fermentação (Fig. 3C).

Quanto ao crescimento do fungo, nota-se diferentes quantidades de biomassa e perfis de curva em função do meio de cultivo. O final da fase log ocorreu após 3 dias nos meios Czapek (Fig. 3A) e Khanna (Fig. 3B) e após 4 dias nos meios SR (Fig. 3C) e Vogel (Fig. 3D). Pode-se observar também que o perfil de produção enzimática coincidiu com o início da fase estacionária do crescimento fúngico em todos os meios de cultivo estudados, indicando assim que há maior expressão da enzima nesta fase de crescimento. Além disso, a variação de pH dos diferentes meios de cultivo ao longo da fermentação mostrou-se bastante semelhante. Em todos os meios, houve uma queda no pH após o primeiro dia de

fermentação, caindo de 5,5 para valores em torno de 4,5. Porém, observa-se uma elevação do pH do meio até o final da fase de crescimento do fungo, atingindo 5,8 no meio Czapek, 6,0 (Fig. 3A) no Khanna (Fig. 3B) e 7,0 no meio SR (Fig. 3C) e 6,5 no meio Vogel (Fig. 3D).

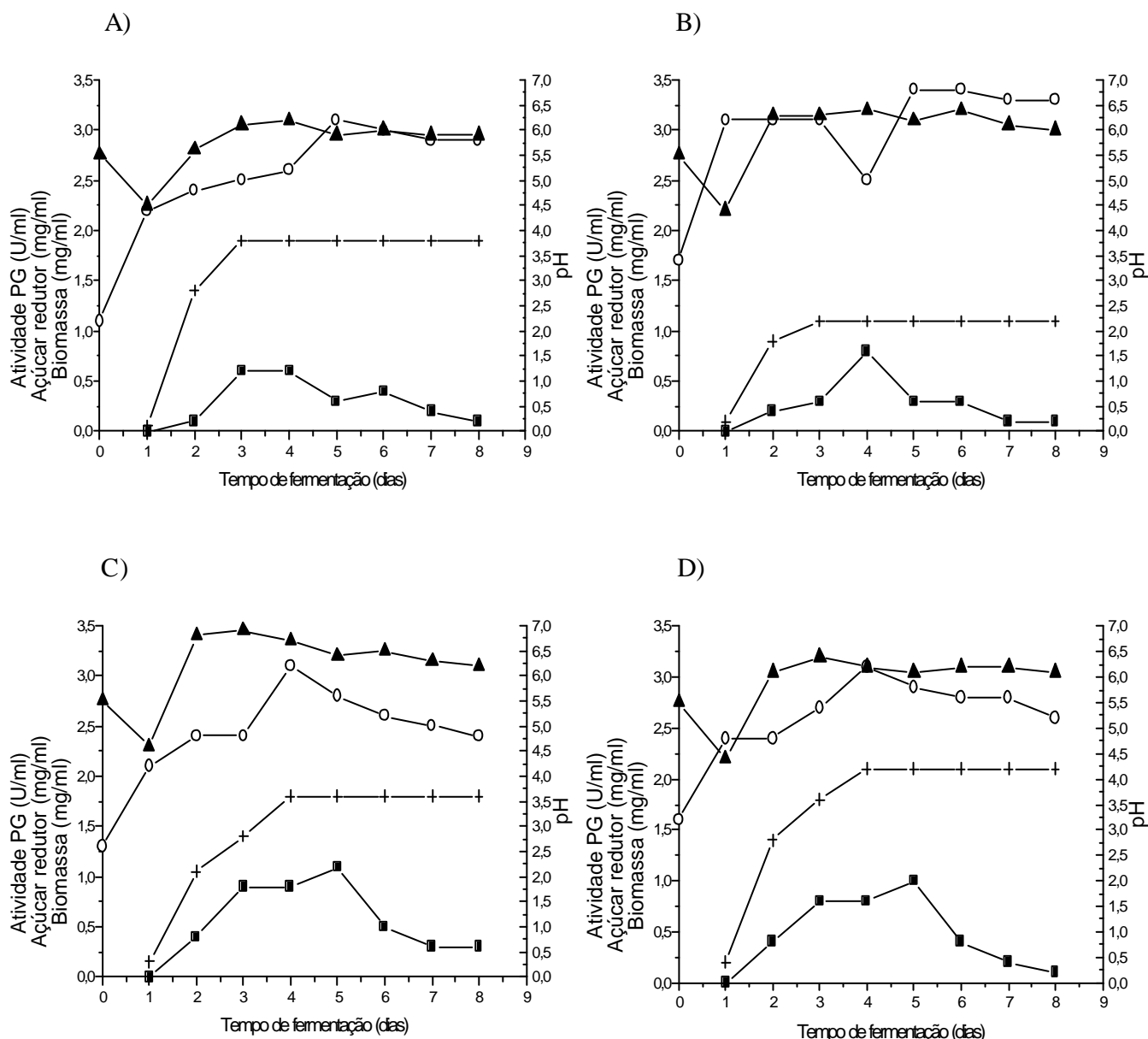


Figura 3: Produção de poligalacturonase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através da fermentação submersa de diferentes meios de cultivo, com a pectina esterilizada junto ao meio nutriente. **A-** Meio Czapek; **B-** Meio Khanna; **C-** Meio SR; **D-** Meio Vogel. -▲- Atividade de PG; -○- Açúcar redutor do meio do meio cultivo; -+? - pH do meio de cultivo; -+? - Biomassa fúngica. Valores expressos como média dos três experimentos.

O aumento do pH do meio de cultivo contrasta com os resultados obtidos por AGUILAR e HUITRON (1986) em estudo da produção de pectinases por *Aspergillus* sp, no qual o pH do meio de cultivo caiu gradativamente ao longo do processo fermentativo.

Por outro lado, corrobora os resultados relatados por SOLÍS-PEREIRA et al (1993), em um estudo da produção de pectinases pelo fungo *Aspergillus niger* em fermentação submersa. O pH inicial do meio de cultivo, que ficava em torno de 4,5, caiu nos primeiros dias de fermentação e, após 120 horas de cultivo, este valor aumentou, principalmente no meio que continha apenas pectina como fonte de carbono, atingindo valor de pH 7,0.

A alcalinização do meio de cultivo em processos fermentativos tem sido geralmente associada com a liberação de amônia resultante do metabolismo de proteínas. Outra possível reação metabólica que leva à alcalinização é a metabolização de ácidos orgânicos (SILVA et al., 2005). Considerando que proteínas e aminoácidos não são as maiores fontes de energia nesta fermentação, provavelmente o último mecanismo citado seja o responsável pela alcalinização do meio.

O conhecimento da variação do pH do meio de cultivo em processos fermentativos visando obtenção de enzimas microbianas é importante, uma vez que este é um fator que regula a expressão enzimática. Além disso, torna-se importante avaliar se ocorrem grandes variações nos seus valores, pois pode-se chegar em uma faixa de pH na qual a enzima pode não ter estabilidade e sofrer desnaturação, por exemplo.

O pH do meio de cultivo tem sido considerado um importante fator na regulação da expressão e secreção de enzimas extracelulares. O primeiro sistema de regulação pelo pH para controle da expressão dos genes em fungos foi descrito para *A. nidulans*. Posteriormente, esse sistema de foi também descrito para outros fungos, como *A. niger*, *S. cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum*, *Yarrowia lipolytica* e *Candida albicans*. Genes responsáveis pela produção de determinadas enzimas são regulados pelo pH ácido enquanto outras, pelo pH alcalino como o caso de proteases e fosfatases ácidas e alcalinas (DENISON, 2000).

Além disso, a modificação das proteínas pós-tradução por glicosilação, que é um processo importante para a conformação, estabilidade, secreção e atividades biológicas das

enzimas também tem sido descrita como sendo regulada pelo pH (CONESA et al., 2001). Variações no pH do meio fermentativo foram descritas por MALDONADO e STRASSER DE SAAD (1998) e YAKOBY et al. (2000) que estudaram a indução de pectinases em *Colletotrichum gloeosporides* inoculado em meio contendo ácido poligalacturônico e pectina de citrus em pHs variando de 3,8 a 6,5. O microrganismo foi cultivado em meio com pH inicial de 3,8 no qual foi observado apenas o crescimento microbiano, sem a produção das pectinases. Posteriormente, notaram que a síntese de poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL) só iniciou em pH 5,0, aumentando até o pH de 5,7. Os autores sugerem que a produção de pectinases ocorreria num mecanismo dependente do pH no qual as enzimas produzidas permaneceriam inativas dentro do micélio fúngico e uma glicosilação em suas estruturas as fariam permanecer inativas, até que as condições de pH fossem favoráveis e estas pudessem ser secretadas.

A quantidade de açúcares redutores presentes inicialmente nos meios contendo pectina comercial como fonte de carbono variou em torno de 0,8 a 1,7 mg/mL, sendo que no final do processo fermentativo a quantidade dos mesmos foi superior à quantidade inicial em todos os meios analisados (Fig. 3 e 4). Este perfil de variação dos níveis de açúcar redutor ao longo do processo fermentativo foi bastante diferente daqueles relatados por SOLÍS-PEREIRA et al. (1993) e por AGUILAR e HUITRON (1986). Segundo esses autores, os níveis de açúcares redutores aumentaram no primeiro dia e decresceram após o segundo dia.

Quando os experimentos foram feitos com a pectina esterilizada separada do meio de cultivo, observa-se que houve maior produção da poligalacturonase em relação ao cultivo realizado com a pectina esterilizada junto ao meio de cultivo (Fig. 4). As maiores produções ocorreram nos meios SR (2,0 U/mL) (Fig. 4C) e Vogel (1,9 U/mL) (Fig. 4D), sendo este último escolhido por apresentar menor custo, uma vez que não contém peptona.

A menor produção de pectinase pode estar relacionada com a maior degradação da pectina quando esta foi esterilizada junto com o meio de cultivo. Uma maior liberação de produtos da hidrólise da pectina, como ácido galacturônico, digalacturônico e/ou trigalacturônico, pode ter reprimido a produção da poligalacturonase pelo fungo. Relatos na literatura indicam que a produção de pectinases pode ser sensível à repressão catabólica,

provocada por produtos da hidrólise da pectina. AGUILAR e HUITRÓN (1986) relataram que houve repressão catabólica de uma pectinase produzida por *Aspergillus* sp em fermentação submersa. Segundo os autores, como há uma diversidade de produtos intermediários formados (como mono, di, tri, e/ou tetra ácidos galacturônicos), há uma dificuldade em precisar qual destes seria o responsável direto pela repressão.

Do mesmo modo que no primeiro experimento (quando a pectina foi esterilizada junto com o meio de cultivo), a maior produção da enzima ocorreu no início da fase estacionária de crescimento do fungo, nos meios em que a pectina foi esterilizada separada. Nota-se também que nesta última condição houve um maior crescimento do fungo, com exceção do meio Vogel, no qual o crescimento foi um pouco menor (cerca de 3,8 mg /mL de peso seco) (Fig. 4D).

Com relação à variação de pH, pode-se observar que nestes ensaios também ocorreu uma queda do pH após o primeiro dia de fermentação. No entanto, esta queda foi mais acentuada do que nos meios em que a pectina foi esterilizada junto ao meio. Quando a pectina foi esterilizada separadamente, o pH caiu para 3,0, 3,2, 3,5 e 3,8 nos meios Czapek (Fig. 4A), Khanna (Fig. 4B), SR (Fig. 4C) e Vogel (Fig. 4D), respectivamente. Além disso, os pHs finais nos meios foram diferentes. O pH ficou em torno de 4,0 no final do processo nos meios Czapek e Khanna e em 6,5 no meio SR e 5,8 no meio Vogel.

A diferença na produção da enzima nos meios contendo pectina como fonte de carbono pode estar relacionada com a fonte e/ou proporção de nitrogênio presente nos mesmos, uma vez que a fonte deste elemento ou a sua proporção variaram conforme o meio utilizado (item 2.2.1- Material e Métodos).

Relatos na literatura indicam que a fonte de nitrogênio pode ser responsável por variações na produção de pectinases microbianas. A influência de compostos nitrogenados como sulfato, fosfato e nitrato de amônia sobre a produção de pectinases tem sido relatada por vários autores. Segundo GALIOTOU-PANAYOTOU et al. (1997) a produção de poligalacturonase pelo fungo *Aspergillus* sp foi maior quando utilizou-se $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como fonte deste elemento no meio em relação ao NH_4NO_3 , com o qual a produção da enzima foi cerca de 60% inferior. SAPUNOVA et al. (1997) estudaram a influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de pectinases por *Aspergillus alliaceus* e seus

resultados mostraram que a melhor fonte foi o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, na concentração de 0,7%. Segundo KALOGERIS et al. (1998), soluções nutrientes contendo sulfato de amônia também mostraram-se eficientes na produção de endoxilanases pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*.

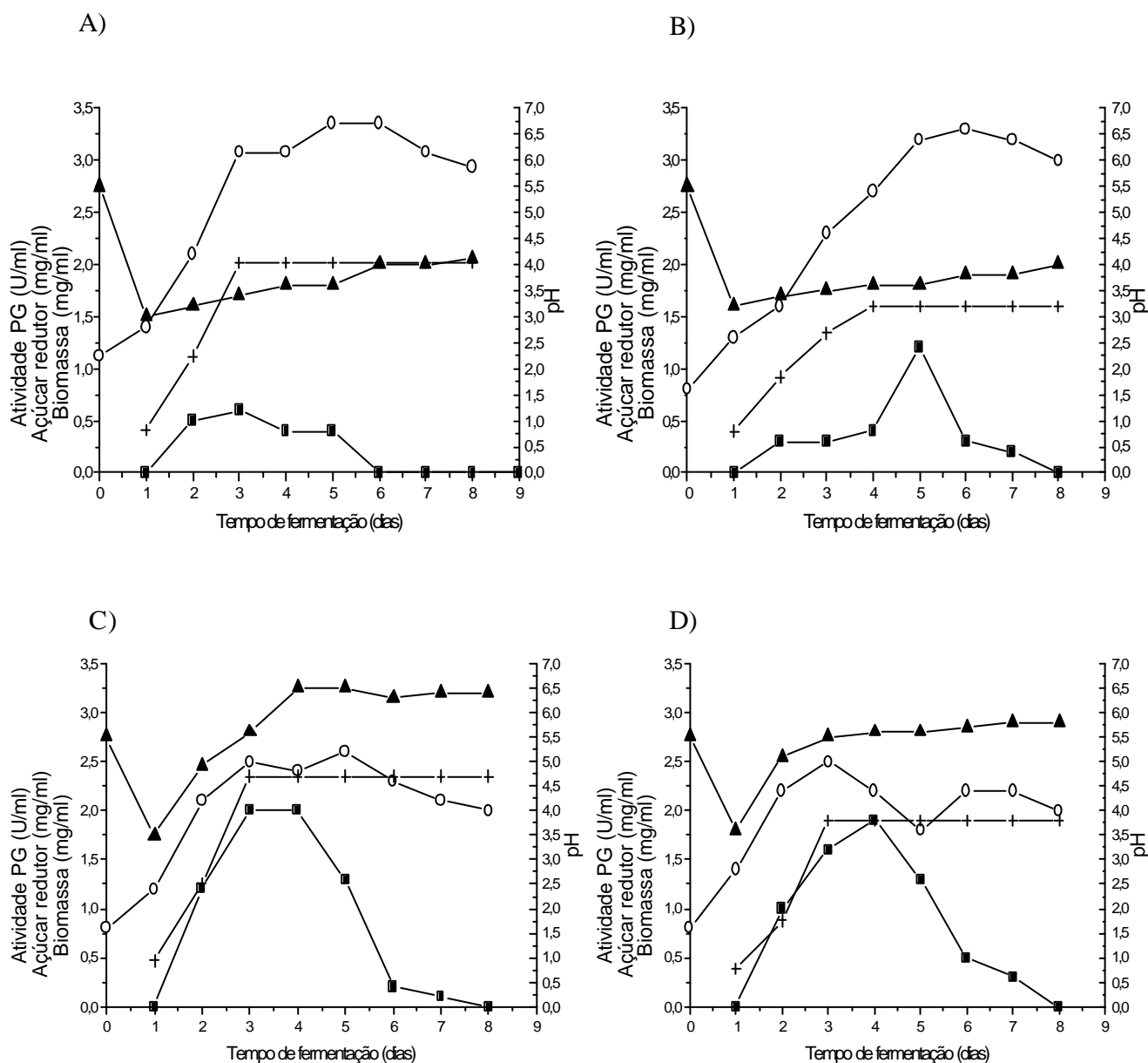


Figura 4: Produção de poligalacturonase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de FSM de diferentes meios de cultivo, com a pectina esterilizada separada do meio nutriente. **A-** Meio Czapek; **B-** Meio Khanna; **C-** Meio SR; **D-** Meio Vogel. -+ - Atividade de PG; -o- Açúcar redutor do meio do meio cultivo; -? - pH do meio de cultivo; +- Biomassa fúngica. Valores expressos como média dos três experimentos.

2- Produção de poligalacturonase em fermentação submersa, utilizando diferentes resíduos agro-industriais como substrato

Após a seleção do meio de cultivo basal mais apropriado para a produção de poligalacturonase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* em fermentação submersa, foram testados diferentes substratos alternativos como fonte de carbono para o crescimento do fungo e produção da enzima, em substituição à pectina comercial. Os resíduos testados foram: bagaço de laranja, casca de maracujá e farelo de trigo. Além disso, foi testado um resíduo líquido do processamento industrial do suco de laranja (a água amarela).

Pode-se observar, através da figura 5, que todos os resíduos estudados proporcionaram uma maior produção de poligalacturonase quando comparada com a obtida nos meios de cultivo contendo pectina comercial.

Em meio com bagaço de laranja, houve dois picos de produção. O primeiro ocorreu após o 3^o dia de fermentação, com uma atividade de 2,0 U/mL e o segundo, no final do processo fermentativo, com uma atividade semelhante (2,1 U/mL) (Fig. 5A). Neste substrato, o teor de açúcar redutor foi mais elevado que o encontrado nos cultivos em que foi utilizado casca de maracujá ou farelo de trigo como substrato (Fig. 5). Porém, não se pode estabelecer uma correlação entre a quantidade inicial de açúcar redutor e atividade enzimática, uma vez que a atividade no bagaço de laranja (Fig. 5A) foi semelhante à encontrada em quando foi utilizado farelo de trigo, no qual a quantidade de açúcar inicial era pequena (Fig. 5C).

Resultados semelhantes foram observados quando foi utilizado casca de maracujá como fonte de carbono. Neste substrato, o primeiro pico ocorreu no 3^o dia de fermentação (2,0 U/mL) e o segundo foi observado após o 8^o dia, com a atividade máxima (3,0 U/mL) (Fig. 5B). Neste meio de cultivo, o teor inicial de açúcar redutor foi de cerca de 1,3 mg/mL.

Em meio com farelo de trigo, também houve dois picos de produção. No entanto, estes ocorreram após o 3^o dia (2,0 U/mL) e o outro após o 7^o (1,8 U/mL). No 8^o dia, a atividade decresceu (1,6 U/mL) (Fig. 5C).

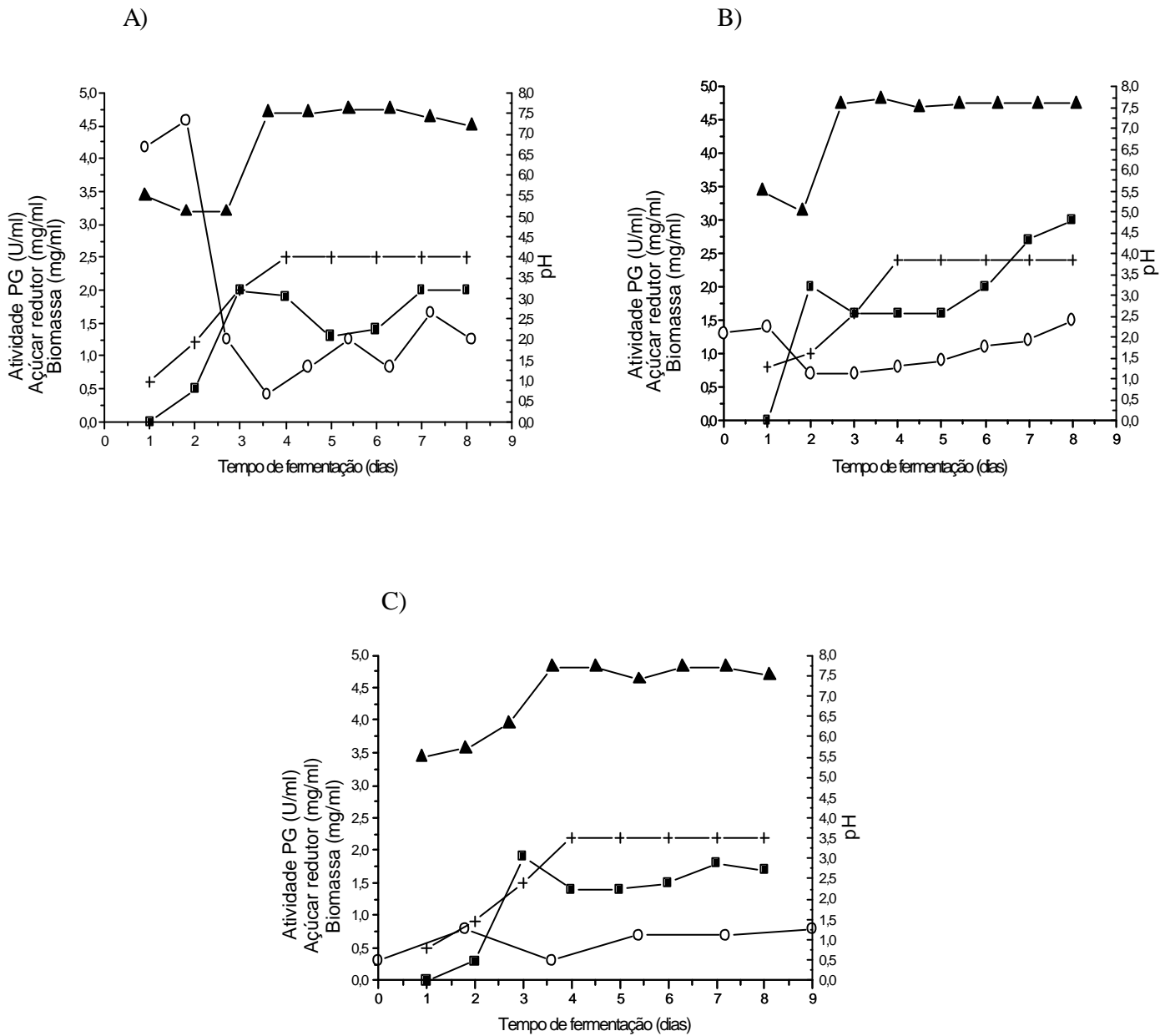


Figura 5: Produção de poligalacturonase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de FSM em meios de cultivo contendo resíduos agro-industriais. **A-** Bagaço de laranja; **B-** Casca de maracujá; **C-** Farelo de trigo. -| - Atividade de PG; -o- Açúcar redutor do meio do meio cultivo; -? - pH do meio de cultivo; +- Biomassa fúngica. Valores expressos como média dos três experimentos.

Resíduos de indústrias processadoras de sucos cítricos têm sido utilizados como substrato para a produção de pectinases fúngicas. FONSECA e SAID (1994) compararam a produção de endo-poligalacturonase em FSM, utilizando polpa de laranja e pectina como indutores da enzima e observaram que a polpa de laranja foi mais eficiente na produção da enzima (0,44 U/mL), em relação à pectina (0,18 U/mL). Resultados similares foram encontrados por LARIOS et al. (1989), que relataram alta produção de endo-PG por *Aspergillus niger*, quando cultivado em meio líquido contendo casca de limão como indutor da enzima. A atividade da enzima foi de 26,17 U/mL e 6,08 U/mL nos meios contendo casca de limão e pectina comercial, respectivamente.

GARZON e HOURS (1992) também conseguiram alta produção de endo-PG, através de FES de casca de laranja pelo fungo *Aspergillus foetidus* (1687,0 U/g).

Na literatura, há também relatos sobre a utilização de farelo de trigo para a produção de pectinases, porém em fermentação estado sólido. CASTILHO et al (2000) utilizaram o fungo *Aspergillus niger* para a produção de pectinases através de FES de misturas de farelo de trigo e farinha de soja. SILVA et al. (2002) conseguiram obter uma boa produção (55,0 U/g) de poligalacturonase pelo fungo *Penicillium viridicatum* RFC3, utilizando bagaço de laranja e farelo de trigo na proporção de 1:1 como substrato.

Os dados obtidos indicam que a casca de maracujá pode ser um bom substrato para a produção de PG pelo fungo *T. aurantiacus*. Como este material é rico em pectina, o mesmo pode ter induzido a expressão da enzima. Entretanto, não foi encontrado na literatura estudos de produção de pectinases com o aproveitamento de casca de maracujá como substrato alternativo.

3- Produção de poligalacturonase em fermentação submersa, utilizando água amarela como substrato

Para avaliar a produção de poligalacturonase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* na água amarela, esta foi testada na forma bruta e também diluída 5 e 10 vezes. A diluição deste material visou avaliar se os altos teores de açúcares redutores presentes no material “in natura” influenciam a produção da enzima.

Como pode ser observado, através da figura 6, a atividade da enzima e o crescimento do fungo foram maiores quando o mesmo foi cultivado na água amarela não diluída. Neste caso, a atividade máxima foi de 3,2 U/mL, após o 5^o dia de fermentação, sendo que, após este período, a atividade decresceu. O teor inicial de açúcar redutor neste substrato foi bastante elevado (4,5 mg/mL), caindo bastante até o final da fermentação, para cerca de 0,6 mg/mL. Porém, os dados obtidos não permitem estabelecer uma correlação direta entre teor de açúcar redutor e atividade enzimática, pois substrato como a casca de maracujá, por exemplo, apresentou baixo teor de açúcar redutor e boa atividade enzimática (Fig. 5C).

O pH do meio de cultivo ao longo do processo fermentativo aumentou neste substrato, ficando em torno de 7,6 no 8^o dia (Fig. 6A).

Quando a água amarela foi diluída, a atividade enzimática caiu significativamente, atingindo um valor máximo de 0,6 U/mL na diluição de 5 vezes (Fig. 6B) e apenas 0,3 U/mL quando o substrato foi diluído 10 vezes (Fig. 6C). Neste último caso, o crescimento do fungo foi bem inferior, possivelmente devido à deficiência de carbono no meio de cultivo, uma vez que o material foi bastante diluído.

Este resíduo foi utilizado por TAVARES et al. (1998), visando diminuir a demanda química de oxigênio (DQO) do resíduo e assim diminuir o seu potencial poluidor e também visando a produção da enzima ribonuclease, sendo que o uso da água amarela mostrou-se viável para os dois processos. Segundo os autores, este resíduo, que é formado por proteínas, óleos essenciais, pectina, açúcares, ácidos orgânicos e sais, é um dos resíduos da indústria de processamento de sucos que mais preocupa, devido aos seus altos índices de matéria orgânica, o que o torna um agente de alto potencial poluidor. Assim, buscando soluções alternativas para o problema do descarte dos resíduos, muitas indústrias têm optado pela utilização de microrganismos como agentes redutores de matéria orgânica desses materiais ou para eliminação ou redução de compostos tóxicos. O uso de microrganismos pode, além de resolver e/ou amenizar problemas ambientais decorrentes do seu descarte, ainda estimular a produção de enzimas microbianas de grande potencial biotecnológico.

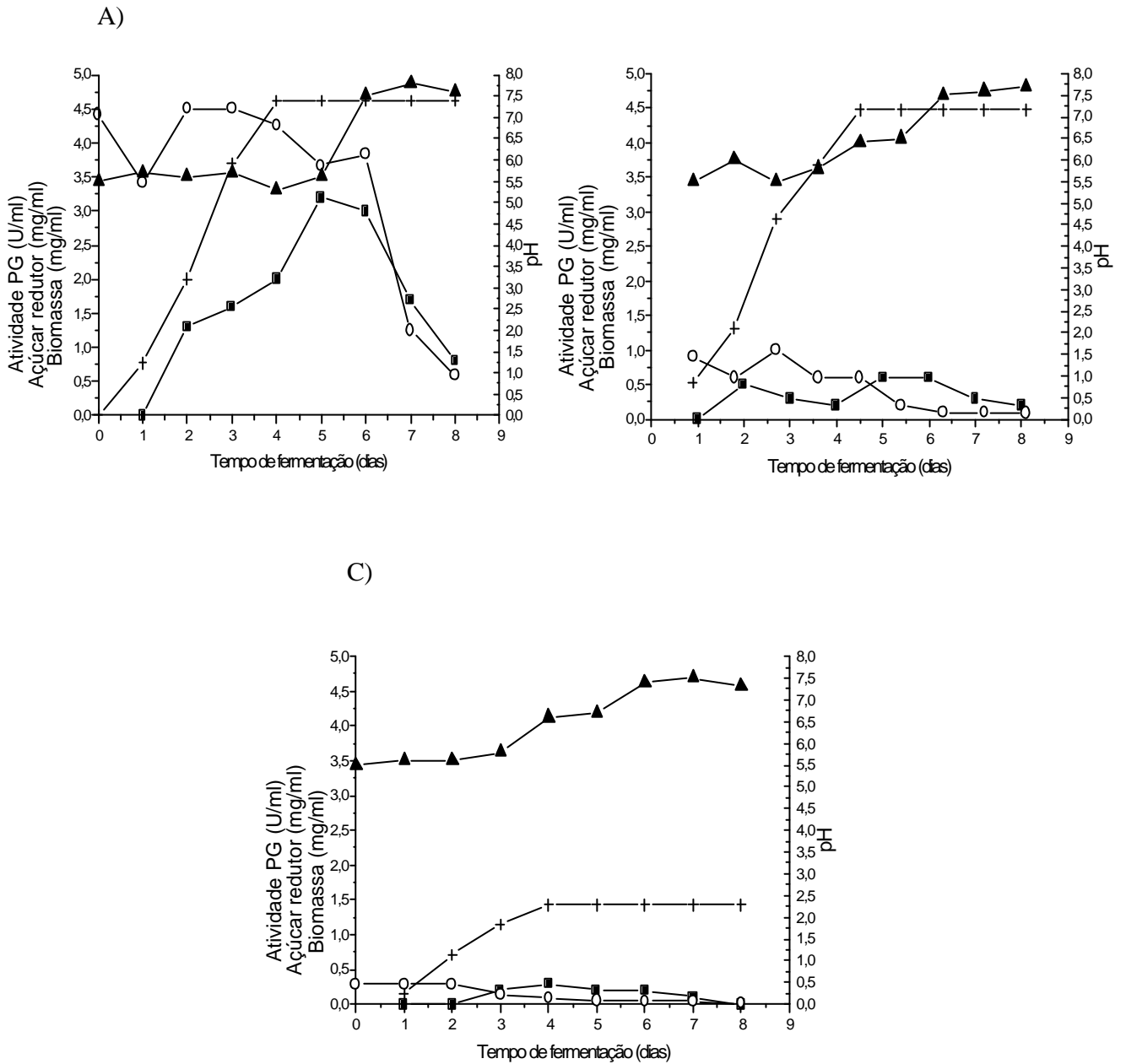


Figura 6 : Produção de poligalacturonase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através da fermentação da água amarela. A- Sem diluição; B- Diluída 5x; C- Diluída 10x. -+ - Atividade de PG; -o- Açúcar redutor do meio do meio cultivo; -? - pH do meio de cultivo; +- Biomassa fúngica. Valores expressos como média dos três experimentos.

4- Efeito do pH inicial e da temperatura de fermentação sobre a produção de PG na água amarela

Após a escolha do substrato e do tempo de cultivo mais apropriados para a produção de PG pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, foi feito um teste para determinar a influência do pH inicial do meio de cultivo e da temperatura de fermentação. Para isto, foi realizado um experimento fatorial, com o cultivo do fungo na água amarela, com pH iniciais de 4,5, 5,0 e 5,5, e nas temperaturas de 45°C e 50°C.

Como pode ser observado na figura 7, as condições mais apropriadas para a produção da enzima foram: pH inicial de 5,5 e temperatura de fermentação de 45°C. No entanto, observa-se que não houve grande variação na atividade em relação às variáveis analisadas, visto que a atividade ficou entre cerca de 2,5 a 3,0 U/mL em todas as condições.

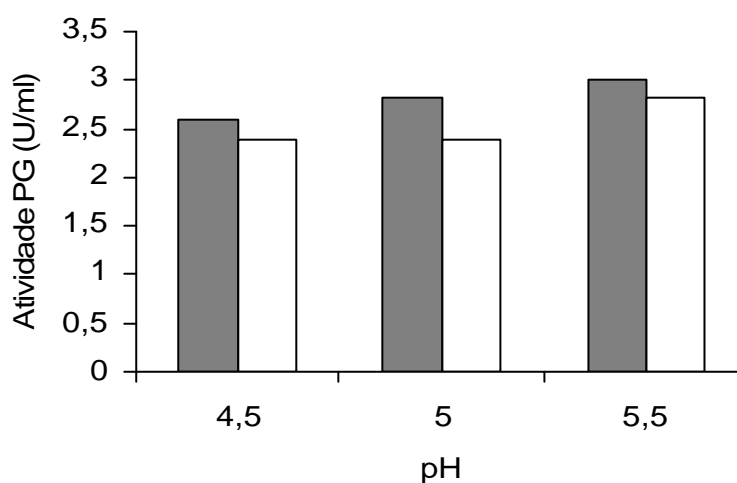


Figura 7: Produção de PG pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* na água amarela, em diferentes valores de pH inicial e de temperatura de fermentação. † 45°C; ? 50°C. Valores expressos como média dos três experimentos.

O pH inicial do meio de cultivo de 5,5 também foi indicado como o mais adequado para a produção de uma poligalacturonase pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, em meio contendo pectato de potássio como substrato (SATHISH-KUMAR e

PALANIVELU, 1998). GALIOTOU-PANAYOTOU et al. (1997) relataram que a maior produção de poligalacturonase por *Aspergillus* sp ATHUM-3482 ocorreu quando o fungo foi cultivado em meio com pH inicial de 5,0.

No trabalho relatado por UEDA et al. (1982), a produção de pectinesterase, poligalacturonase e pectina liase por *Aspergillus oryzae* A-3 variou de acordo com o pH inicial do meio. Segundo os autores, as diferenças na produção estariam relacionadas com a estabilidade das enzimas nos diferentes valores de pH. Além das pectinases, a influência do pH de substratos compostos por resíduos agro-industriais é relatada também para outras enzimas, tais como celulasas e xilanases (ABD EL-NASSER et al., 1997; JECU, 2000).

AGUILAR et al (1991) relataram que a produção de enzimas microbianas é altamente influenciada pelo pH do meio de cultura, sendo amplas as evidências deste fato para vários tipos de microrganismos. Segundo DENISON et al. (2000), o pH do ambiente em que os fungos se desenvolvem afeta vários processos metabólicos nestes organismos, tais como a produção de enzimas extracelulares, antibióticos e toxinas. Neste trabalho, o autor descreve um sistema de regulação da expressão de alguns genes do fungo *Aspergillus nidulans* pelo pH do meio, no qual o pH regula a expressão de genes responsáveis pela produção de fosfatases ácidas e alcalinas.

As temperaturas de fermentação geralmente utilizadas para fungos termofílicos são de 45°C e 50°C (SATHISH-KUMAR e PALANIVELU, 1998; PUCHART et al., 1999; KAUR et al., 2004). No entanto, não foram encontrados na literatura, trabalhos de influência do pH inicial do meio de cultivo e da temperatura de fermentação, sobre a produção de pectinases de termofílicos.

5- Caracterização físico-química das poligalacturonases produzidas em FES e FSM

As poligalacturonases brutas produzidas em fermentação submersa (em meio de água amarela) e em fermentação em estado sólido (no substrato composto por 30% bagaço de cana e 70% bagaço de laranja), nas condições fermentativas determinadas nos ensaios anteriores de produção, foram caracterizadas quanto ao pH e temperatura ótimos para sua atividade e quanto à estabilidade ao pH e temperatura.

5.1- Efeito do pH sobre a atividade das enzimas

Com relação à influência do pH na atividade da PG produzida em fermentação em estado sólido, nota-se que a atividade foi maior na faixa de pH entre 3,5 e 5,0 (valor no qual ocorreu a atividade máxima) e decresceu em pH superior, sendo que em pH 7,0 já não foi mais detectada atividade enzimática (Fig. 8).

Para a PG produzida em fermentação submersa, a atividade também aumentou até o pH 5,0, porém este valor ficou muito próximo ao obtido no pH 5,5. Acima deste pH, houve uma queda acentuada na atividade enzimática, sendo que no pH 6,0 esta foi de apenas 24% da atividade máxima e no pH 7,5 esta já não foi mais detectada (Fig. 8).

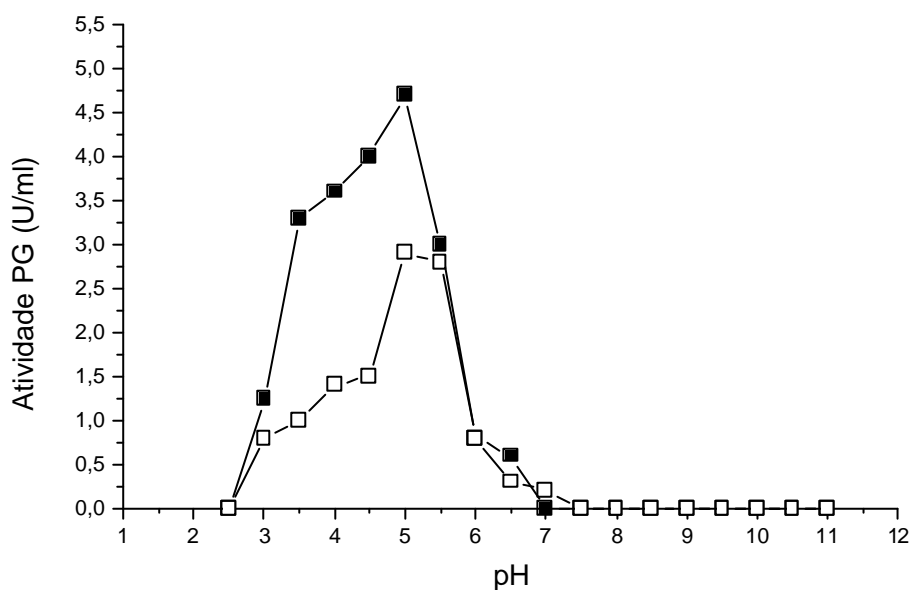


Figura 8: Efeito do pH sobre a atividade das pectinases brutas produzidas por *Thermoascus aurantiacus* em FES em meio de 30% de bagaço de cana e 70% de laranja e em FSM na água amarela. Tampões: acetato 2,5-5,5; citrato 5,5-7,0; tris-HCl 7,0-8,5; glicina 8,5-11,5. -FES; -?- FSM.

Resultados similares foram encontrados por ACUÑA-ARGÜELLES et al (1995). A poligalacturonase produzida pelo fungo *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido apresentou uma faixa de pH ótimo maior (3,5-5,0), em comparação à obtida em

fermentação submersa (4,0-5,0). Em valores superiores a 6,0, praticamente já não foi mais detectada atividade enzimática.

Estes resultados são semelhantes aos obtidos por ZENGH e SHETTY (2000), que relataram que o pH ótimo da exo-PG produzida por *Lentinus edodes* foi 5,0 e que, em valores maiores que 7,0, esta praticamente não foi detectada.

O pH é um dos principais fatores que afetam as proteínas em geral. As variações de pH alteram o estado iônico das cadeias laterais dos aminoácidos, alterando assim a distribuição de cargas e a exigência de pontes de hidrogênio (VOET, 2000). Em extremos de pH, tanto altos como baixos, pelo menos algumas cargas das proteínas estarão faltando e, por isso, as interações eletrostáticas que normalmente estabilizariam a forma funcional nativa da proteína estarão reduzidas de modo drástico, levando dessa forma à sua desnaturação (CAMPBELL, 2000). Desse modo, é importante avaliar em que faixa de pH uma enzima de interesse atua melhor, visando-se assim otimizar algum processo em que ela possa ser utilizada.

5.2- Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas

Através da figura 9, observa-se que a temperatura ótima para a atividade das PGs ficou em torno de 60-65°C. A PG obtida da fermentação em estado sólido teve a sua atividade aumentada até a temperatura de 65°C, na qual ocorreu o pico de atividade (4,8 U/mL). Em valores mais elevados de temperatura, a atividade decresceu, perdendo cerca de 87% de atividade a 85°C. A enzima obtida na fermentação submersa mostrou um aumento na sua atividade até a temperatura de 60°C, apresentando redução gradual dessa atividade em temperaturas acima deste valor. A 85°C, a atividade foi reduzida a apenas 17% da atividade máxima (Fig. 9).

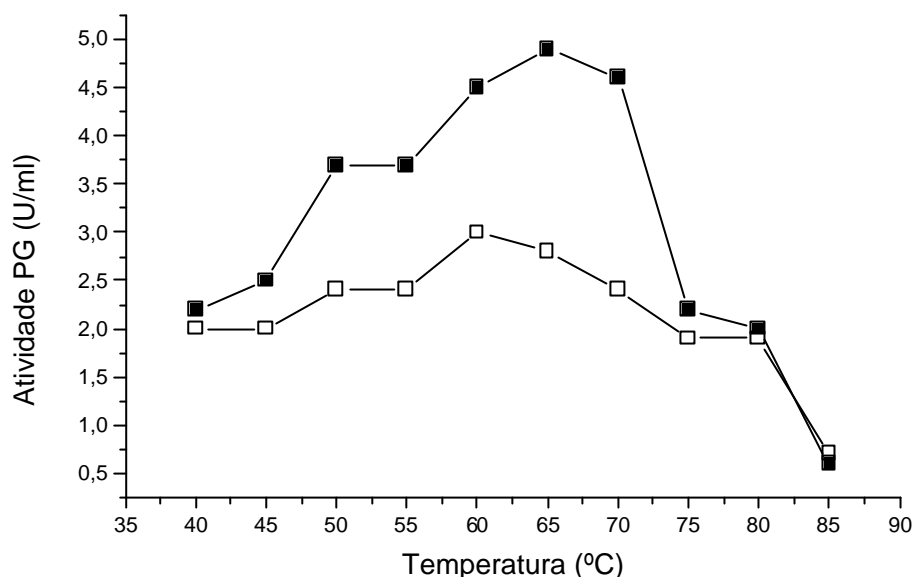


Figura 9: Efeito da temperatura sobre a atividade das pectinases brutas produzidas por *Thermoascus aurantiacus* através de FES em meio de 30% de bagaço de cana e 70% de laranja e em FSM na água amarela. -■- FES; -□- FSM.

A influência da temperatura sobre a atividade das pectinases de microrganismos mesofílicos é relatada por vários autores. Segundo BRUMANO et al. (1993), a temperatura ótima da pectina liase produzida por *Penicillium griseoroseum* foi 50°C, sendo que a 65°C, esta enzima praticamente não foi detectada. Esta temperatura ótima foi a mesma encontrada para a PGs produzidas pelos fungos *Aspergillus carbonarius*, através fermentação em estado sólido de farelo de trigo (SREEKANTIAH et al., 1975) e *Lentinus edodes*, crescendo em polpa de morango, no mesmo processo fermentativo (ZHENG e SHETTY, 2000). MARTIN et al. (2004) relataram que a temperatura ótima da produzida PG pelo fungo mesofílico *Moniliella* sp SB9 foi 55°C, enquanto que a de *Penicillium* sp. EGC5 foi 40°C.

Entretanto, poucas informações existem a respeito de pectinases brutas de fungos termofílicos. Dados sobre exo-PG de *Thermomyces lanuginosus*, apresentados por SATHISH-KUMAR e PALANIVELU (1998) indicam temperatura de 70°C para a

atividade ótima da enzima, embora o mesmo fungo também tenha produzido outra poligalacturonase, com atividade ótima a 60°C.

A temperatura é um outro fator fundamental para que as proteínas estejam na sua forma funcional adequada ou então sejam desnaturadas. Na desnaturação pelo calor, o aumento da temperatura favorece vibrações no interior da molécula e a energia dessas vibrações pode tornar-se grande o suficiente para desfazer a sua estrutura terciária e conseqüentemente desnaturá-la (CAMPBELL, 2000). Portanto, assim como para o pH, é importante selecionar a temperatura mais adequada para a atividade de uma enzima, principalmente do ponto de vista da sua aplicação.

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

Após a determinação do pH e temperatura ótima de atividade das PGs brutas, foram feitos testes para se determinar a estabilidade das mesmas frente à variações de pH e temperatura, quando em ausência de substrato.

Com relação à estabilidade ao pH, a enzima produzida em FES mostrou-se estável em duas faixas distintas de pH: em pH 4,0-5,0, cuja estabilidade ficou acima de 90% e na faixa entre 7,5 e 8,5, na qual manteve 100% de sua atividade original. A mesma preservou cerca de 70% de sua atividade original em pH 11,0 (Fig. 10).

A enzima obtida por FSM mostrou um perfil de estabilidade ao pH diferente daquele observado para aquela produzida por FES. A PG produzida em FSM manteve cerca de 91% da atividade original em pH 3,0-3,5. Em valores de pH superiores, houve uma queda gradual na sua estabilidade. Porém, esta ainda manteve cerca de 60% da atividade em valores de pH elevados (10,5-11,0) (Fig. 10).

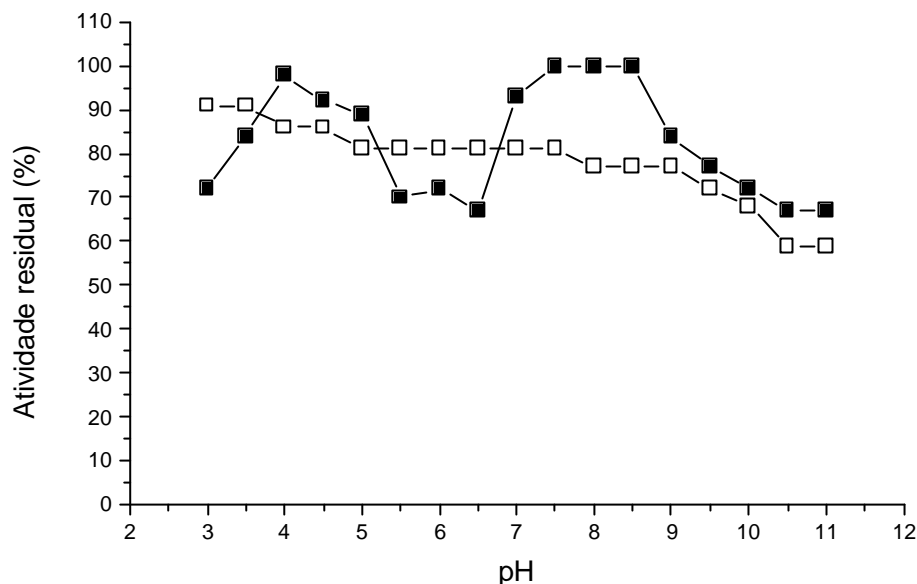


Figura 10: Estabilidade das pectinases brutas produzidas pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de FES em meio de 30% de bagaço de cana e 70% de laranja e em FSM na água amarela., frente a variações de pH, em ausência de substrato. -■- FES; -□- FSM.

A estabilidade ao pH de pectinases produzidas por FES e FSM pelo fungo *Aspergillus niger* CH4 em FES, foi relatada por ACUÑA-ARGÜELLES et al. (1995). A exo-PG produzida em FES mostrou ser muito mais estável ao pH quando comparada com a obtida em FSM. No primeiro processo, a mesma preservou 100% da atividade na faixa de pH de 4,0 a 5,0 e ainda manteve uma maior atividade em valores de pH superiores em relação à obtida em FSM, a qual mostrou-se bem mais sensível às variações de pH, mantendo-se estável apenas em pH 4,0-4,5.

HOURS et al. (1988) relataram a caracterização da enzima pectinesterase, produzida através de fermentação em estado sólido de polpa de maçã. A enzima mostrou-se estável apenas na faixa de pH entre 4,0-4,5, sendo que em valores superiores a mesma perdeu quase toda atividade. Já a poligalacturonase produzida por *Bacillus* sp. em meio de cultivo contendo farelo de trigo apresentou estabilidade em valores elevados de pH (9,0-10,5).

Com relação à termoestabilidade das enzimas, em ausência de substrato, nota-se que a PG obtida da FES manteve 100% da atividade original quando incubadas por 1 hora até a temperatura de 50°C. Quando exposta a 60°C, manteve cerca de 85%. Já quando exposta a 70°C, houve uma queda acentuada, sendo que nesta temperatura apenas 30% do valor inicial foram preservados. No entanto, ainda foi detectada atividade a 80°C, com uma atividade residual de cerca de 15% (Fig. 11).

Pode ser observado também que a enzima produzida em FSM apresentou uma menor termoestabilidade em relação àquela produzida na FES. Esta característica se torna mais evidente quando ambas foram expostas a 60°C. Neste último caso, enquanto a enzima da FES manteve 82% da atividade nesta temperatura, a obtida na FSM manteve apenas 13% da sua atividade original. Além disso, preservou apenas 6% a 70°C e, quando mantida a 80°C, esta não foi mais detectada (Fig. 11).

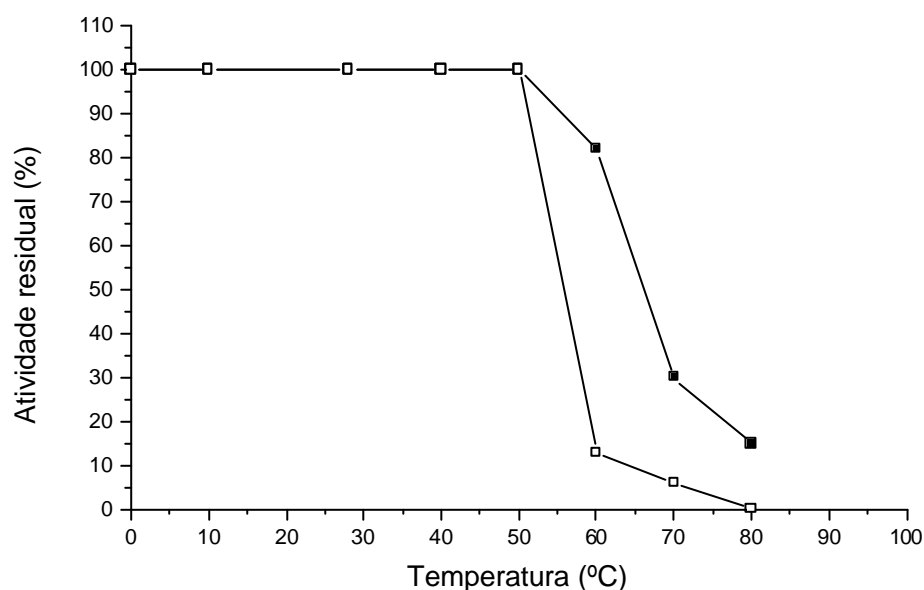


Figura 11: Estabilidade à temperatura das pectinases brutas produzidas por *Thermoascus aurantiacus* através de FES em meio de 30% de bagaço de cana e 70% de laranja e em FSM na água amarela por 1 hora, em diferentes temperaturas. -□- FES; -■- FSM.

Estes dados corroboram estudos encontrados na literatura, os quais relatam que as enzimas brutas produzidas por FES são geralmente mais termoestáveis que as produzidas por FSM.

A estabilidade à temperatura de pectinases produzidas pelo mesofílico *Aspergillus niger* CH4 em FES e FSM, foi relatada por ACUÑA-ARGÜELLES et al. (1995). As enzimas endo e exo-poligalacturonase e pectina liase mostraram uma termoestabilidade bem maior quando produzidas por FES. As três enzimas apresentaram uma estabilidade semelhante até 50°C, porém em temperaturas superiores a termoinativação foi bem mais acentuada nas enzimas produzidas em FSM. A 60°C, a endo-PG produzida por FES preservou cerca de 75% da atividade original, enquanto a produzida por FSM perdeu toda atividade. A exo-PG manteve cerca de 60% e 50% em FES e FSM, respectivamente. Já a pectina liase obtida por FES preservou cerca de 55% da atividade original nesta temperatura, enquanto que obtida por FSM perdeu praticamente toda atividade.

ZHENG e SHETTY (2000) relataram que a exo-poligalacturonase produzida por *Lentinus edodes* mostrou-se estável até 50°C e, quando pré-incubada a 60°C durante 20 minutos, manteve cerca de 40% da atividade original. Esta termoestabilidade foi bem menor que aquela apresentada pelas enzimas brutas produzidas pelo *T. aurantiacus*, uma vez que as primeiras foram totalmente desnaturadas quando expostas à temperatura de 70°C por 30 minutos. As pectinases brutas de outras linhagens de *Aspergillus niger* também têm sido descritas como sendo susceptíveis à desnaturação em temperaturas acima de 50°C (BAILEY, 1990).

A boa termoestabilidade das enzimas produzidas por *Thermoascus aurantiacus* é uma característica desejável, uma vez que estas podem ser utilizadas em processos industriais que requerem altas temperaturas. A clarificação enzimática de sucos, por exemplo, pode ocorrer em temperaturas entre 15°C por 12 horas ou a 54°C por 1-2 horas. Em temperaturas intermediárias não são usadas devido ao risco de contaminação com leveduras. Embora temperaturas superiores a 54°C sejam desejáveis, visto que levam à redução da viscosidade do suco e suprime a etapa de pasteurização, o fator limitante de sua aplicação é a estabilidade do preparado enzimático usado, que freqüentemente não excede

50°C (LEA, 1998). Portanto, enzimas termoestáveis e com temperaturas ótimas de atuação elevadas são importantes para este processo.

6- Purificação das enzimas

A purificação das enzimas produzidas em FSM e FES foi conseguida após a aplicação das mesmas em cromatografias de filtração em gel e troca iônica. Após a purificação, as enzimas foram então caracterizadas. A atividade de poligalacturonase no extrato bruto é maior na FES. Porém, como o extrato bruto obtido da FSM foi concentrado duas vezes mais que o da FES (conforme citado no item 7.1-Material e Métodos), a atividade da enzima do primeiro processo aparece maior que a deste último.

6.1- Fracionamento das poligalacturomases produzidas em FES e FSM em cromatografia de filtração em gel

Os extratos enzimáticos obtidos do cultivo em fermentação em estado sólido (nas condições fermentativas definidas em trabalho prévio) e em fermentação submersa (após a escolha do melhor substrato e das condições fermentativas mais adequadas para a produção da enzima neste processo), foram aplicados em coluna de cromatografia de filtração em gel (Pharmacia), contendo gel Sephadex G-75.

Com relação à enzima produzida em FSM, pode-se observar, através da figura 12A, que nos tubos eluídos houve apenas um pico de atividade enzimática, sendo este detectado a partir do volume de eluição de 197,4 mL até o volume de 285,4 mL. Em cada tubo, também foi feita a dosagem de proteínas totais. No entanto, não houve detecção de proteínas no material eluído, provavelmente devido à diluição do material após a passagem pela coluna e baixo teor de proteína na solução bruta.

A atividade específica após a filtração em gel aumentou de 365,0 U/mg de proteína para 5.000,0 U/mg. O fator de purificação neste processo foi de 13,7 vezes, com um rendimento de 66,0% (Tab. 3). As frações com maior atividade enzimática foram juntadas para posterior aplicação na cromatografia de troca iônica.

A solução enzimática proveniente da fermentação em estado sólido, após aplicação na mesma coluna, também mostrou somente um pico de atividade da enzima. A enzima foi detectada a partir do volume de 160,0 mL até o volume de 256,2 mL, o qual foi muito semelhante ao da FSM. Nota-se também que o teor de proteínas eluídas foi muito maior na amostra proveniente da FES do que aquela da FSM. Esse dado pode justificar o menor fator de purificação observado nessa fase do segundo processo de purificação (Fig. 12B).

Para a enzima obtida da FES, a atividade específica após a filtração em gel aumentou de 60,0 U/mg de proteína para 331,6 U/mg. O fator de purificação neste processo foi de 5,2 vezes, com um rendimento de 58,8% (Tab. 4). As frações contendo maior atividade enzimática foram então juntadas para aplicação na cromatografia de troca iônica.

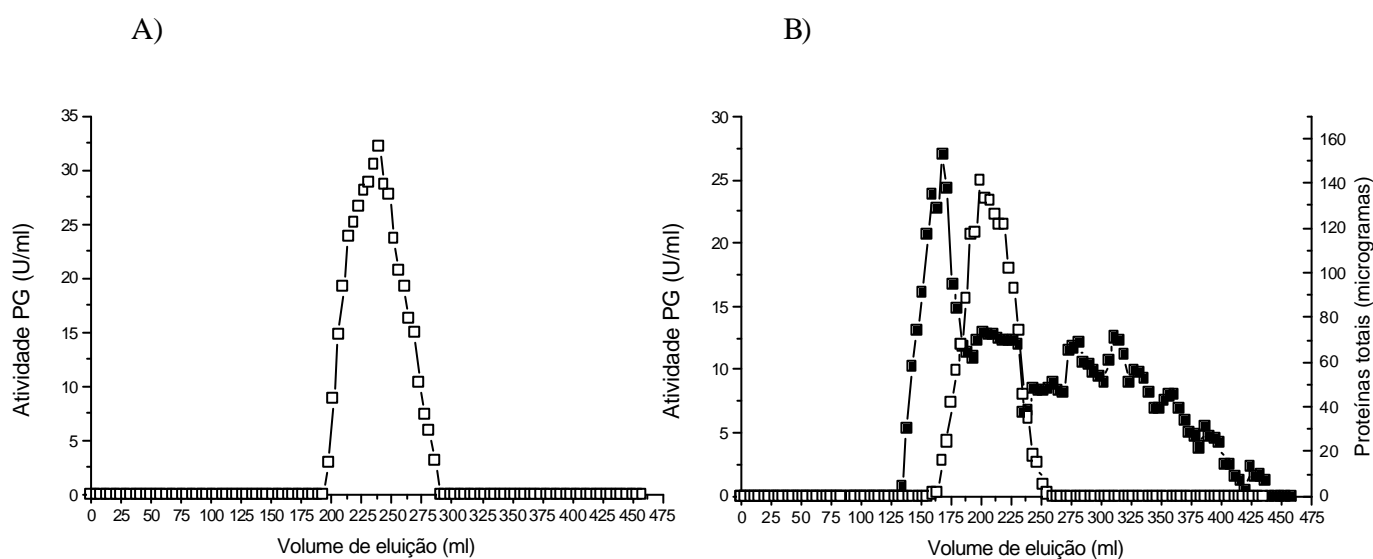


Figura 12: Perfil de eluição das poligalacturonases produzidas por *Thermoascus aurantiacus* aplicadas em coluna de cromatografia de filtração em gel, contendo gel Sephadex G75. **A-** Fermentação Submersa (FSM); **B-** Fermentação em Estado Sólido (FES). -? - Atividade PG; -! - Proteínas totais.

6.2- Fracionamento das poligalacturonases produzidas em FES e FSM em cromatografia de troca iônica

Antes da aplicação das enzimas na troca iônica, foram feitos testes preliminares com diferentes resinas, em diferentes valores de pH, visando determinar qual resina e pH deveriam ser utilizados para este processo. Após estes testes, a resina escolhida foi a SP Sepharose (troca catiônica) no pH 5,0 (para a PG obtida da FSM) e pH 4,0 (para a da FES).

Para aplicação da enzima da FSM, um volume total de 50 mL foi aplicado na SP Sepharose. Para a eluição, foi utilizado tampão acetato-NaOH 20 mM pH 5,0. O fluxo foi fixado em 0,28 mL/min., sendo coletados 4,2 mL em cada tubo. Como pode ser observado na figura 13A, a enzima começou a ser eluída da resina quando a molaridade de NaCl estava em torno de 0,6M. Vale ressaltar que neste caso também não foi possível detectar a absorbância a 280 nm de cada tubo. A atividade específica após a troca iônica aumentou de 5.000,0 U/mg de proteína para 7.687,5 U/mg. O fator de purificação ao final deste processo foi de 21,1 vezes, com um rendimento final de 30,8% (Tab. 3).

Com relação à enzima proveniente da FES, também foi aplicado um volume total de 50mL, sendo utilizado, neste caso, tampão acetato-NaOH 20 mM pH 4,0. O fluxo também foi fixado em 0,28 mL/min., sendo coletados 4,2 mL por tubo. Através da figura 13B, pode-se observar que a poligalacturonase começou a ser eluída somente quando havia uma concentração bastante elevada de NaCl na resina (cerca de 0,9M), o que indica que a enzima apresenta uma alta afinidade pela mesma, no pH utilizado. Vale ressaltar que, neste caso, foi utilizado o pH 4,0 porque foi feito previamente um teste com a resina, em diferentes valores de pH, sendo observado que a mesma se adere mais fortemente na SP Sepharose em pH 4,0, quando comparado com o pH 5,0.

Nesta cromatografia foi possível acompanhar o perfil de eluição de proteínas que ainda estavam presentes na amostra, após a passagem pela filtração em gel. Pode-se observar que, antes do gradiente salino, foram detectados dois picos de proteína, entre os volumes de eluição de 42,0 mL e 88,2 mL. Após o início do gradiente salino, ocorreram três picos de proteínas, entre aproximadamente 0,15M e 0,7M de NaCl, sendo que a poligalacturonase foi eluída posteriormente, com o pico da enzima saindo com uma concentração salina de cerca de 1M.

Para esta enzima, a atividade específica após a troca iônica aumentou de 331,6 U/mg de proteína para 5351,5 U/mg. O fator de purificação ao final deste processo foi de 69,2 vezes, com um rendimento final de 14,2% (Tab. 4). O fator de purificação obtido na purificação desta foi bem maior que o apresentado para a enzima da FSM, uma vez que o teor inicial de proteínas no extrato bruto da FES era mais elevado (30,0 mg) em relação ao encontrado no extrato bruto da FSM (6,84 mg).

Outra diferença observada refere-se ao rendimento final da purificação das duas enzimas. Para a PG da FSM, o rendimento foi de 30,8%, enquanto para a PG da FES o valor foi de 14,2%. Isto pode ser explicado pelo número de frações puras, obtidas após os dois processos cromatográficos. Após aplicação na troca iônica, em 24,6 mL (correspondentes a 6 tubos coletados) a enzima estava pura, enquanto que na obtida em FES a PG estava pura em 12,6 mL (correspondentes a 3 tubos coletados), fazendo assim com que o rendimento final do processo fosse menor.

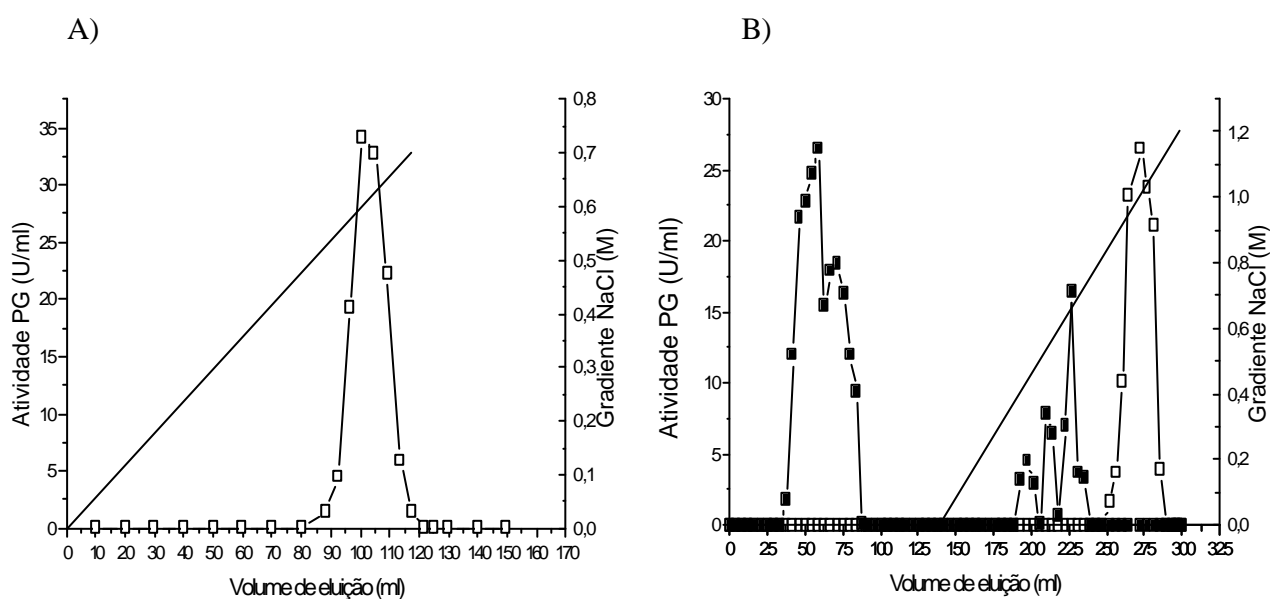


Figura 13: Perfil de eluição das poligalacturonases produzidas por *Thermoascus aurantiacus* aplicadas na coluna de cromatografia de troca iônica SP Sepharose. **A-** Fermentação Submersa (FSM); **B-** Fermentação em Estado Sólido (FES). -?- Atividade PG; -|- Proteínas totais.

Além da medida da atividade de poligalacturonase através da determinação de açúcar redutor avaliado pelo método do DNS, foi feita também a medida da atividade de endopoligalacturonase em viscosímetro, através da medida da redução de viscosidade do substrato. Através da tabela 5, pode-se observar que a atividade de endo-PG no extrato purificado da FSM foi de 1,5 U/mL, com uma atividade específica de 369,0 U/mg e para a enzima pura obtida da FES, a atividade de endo-PG foi de 1,68 U/mL, com atividade específica de 442,1 U/mg. Esses dados indicam que as enzimas puras obtidas dos dois processos fermentativos analisados apresentam maior atividade de exo-PG, embora tenha apresentado também redução da viscosidade do substrato, o que corresponde à característica de endo-PG.

As tabelas 3, 4 e 5 sintetizam os resultados da purificação das poligalacturonases produzidas por *T. aurantiacus* em FSM e FES.

Tabela 3: Purificação da poligalacturonase produzida por *T. aurantiacus* em fermentação submersa.

Etapa	Volume (ml)	U/ml	U Total	mg proteína/ml	Proteína total (mg)	U/mg proteína	Rendimento (%)	Fator de purificação
Bruta liofilizada	8	312,0	2496,0	0,855	6,84	365,0	100	1
Sephadex G-75	55	30,0	1650,0	0,006	0,33	5000,0	66,0	13,7
SP Sepharose	24,6	31,25	768,7	0,004	0,10	7687,5	30,8	21,1

Tabela 4: Purificação da poligalacturonase produzida por *T. aurantiacus* em fermentação em estado sólido.

Etapa	Volume (ml)	U/ml	U Total	mg proteína/ml	Proteína total (mg)	U/mg proteína	Rendimento (%)	Fator de purificação
Bruta liofilizada	8	225,0	1800,0	3,75	30,0	60,0	100	1
Sephadex G-75	54	19,6	1058,4	0,059	3,19	331,6	58,8	5,2
SP Sepharose	12,6	20,3	255,8	0,0038	0,0478	5351,5	14,2	69,2

Tabela 5: Atividade específica de endo-PG das poligalacturonases purificadas de *T. aurantiacus*.

Processo fermentativo	Atividade (U/ml)	Atividade específica (U/mg)
FSM	1,5	369,0
FES	1,68	442,1

7- Eletroforese em PAGE-SDS para avaliação da pureza das enzimas e determinação da massa molar

Após aplicação das enzimas nas cromatografias de filtração em gel e de troca iônica, foi feita eletroforese, para avaliar o grau de pureza das enzimas e também para estimar as suas massas molares. Os géis são mostrados na figura 14. Conforme pode ser observado, as duas enzimas foram purificadas à homogeneidade, sendo que ambas apresentam massas molares muito próximas.

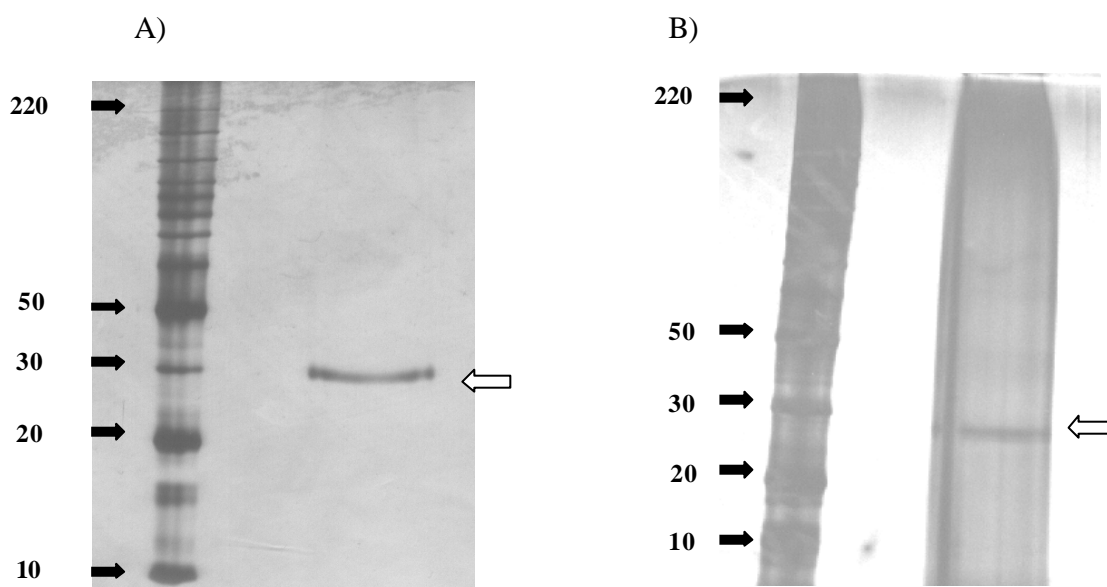


Figura 14: Eletroforese das poligalacturonases produzidas por *T. aurantiacus*. A) FSM; B) FES. Os valores de massa molar estão expressos em kDa.

Através de uma regressão linear, plotando os valores do logaritmo da massa molar dos padrões utilizados *versus* os valores (em cm) da migração relativa de cada padrão (Fig. 15) e das enzimas, foram estimadas suas massas molares. Para a enzima obtida em FSM (Fig. 14A), o valor estimado foi de 30,1 kDa, enquanto que o da enzima obtida em FES foi de 29,3 kDa.

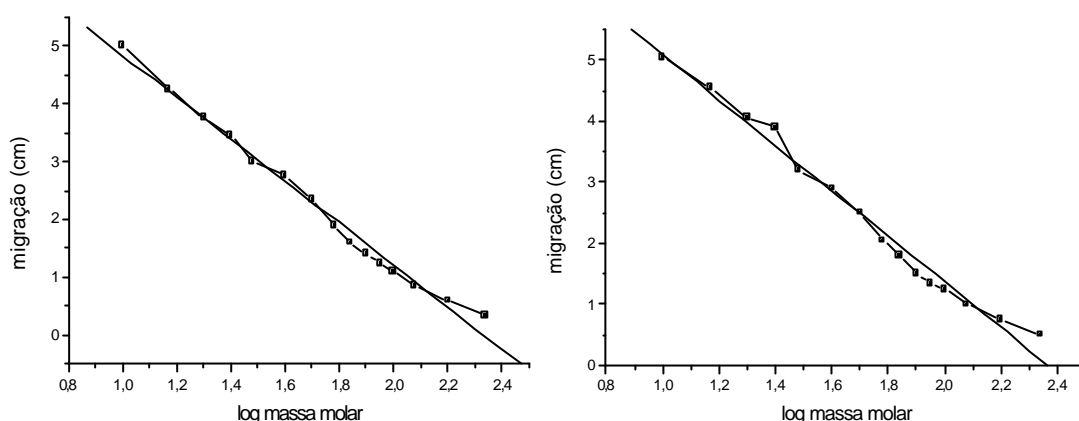


Figura 15: Retas padrão obtida pela plotagem do log da massa molar dos padrões *versus* da migração relativa (cm) de cada padrão e das enzimas. A) FSM; B) FES.

Regressão linear PG FSM

$$Y = A + B * X$$

Parâmetro Valor Erro

A	8,468	0,19
B	-3,63	0,108

R SD N P

-0,994	0,157	15	<0.0001
--------	-------	----	---------

Regressão linear PG FES

$$Y = A + B * X$$

Parâmetro Valor Erro

A	8,81	0,226
B	-3,722	0,129

R SD N P

-0,992	0,187	15	<0.0001
--------	-------	----	---------

$$X = \frac{\text{migração PG (cm)} - A}{B}$$

$$x = \frac{3,1 - 8,468}{-3,63} = 1,479$$

Massa molar = antilog x = 30,1 kDa

$$X = \frac{\text{migração PG (cm)} - A}{B}$$

$$x = \frac{3,35 - 8,81}{-3,72} = 1,468$$

Massa molar = antilog x = 29,3 kDa

Os valores de massa molar encontrados para as duas poligalacturonases do fungo *Thermoascus aurantiacus* são similares aos de poligalacturonases produzidas por outros fungos. SAITO et al. (2004) relataram a purificação de uma endo-PG com 29,7 kDa e NITURE e PANT (2004) purificaram uma PG com 30,6 kDa.

Por outro lado, são menores que outras PGs fúngicas descritas na literatura, as quais apresentam massa molar maior que 40 kDa. ISSHIKI et al. (2000) purificaram uma exo-PG com 43 kDa e uma endo-PG com 42 kDa. CABANE e DONÈCHE (2002) descreveram a

purificação de uma endo-PG de 52 kDa e de uma exo-PG de 65 kDa. Valores similares foram encontrados para exo-PGs produzidas pelos fungos *Thermomyces lanuginosus* (59 kDa), *Fusarium oxysporum* (63 kDa), *Botrytis cinerea* (66 e 70 kDa) (SATHISH-KUMAR e PALANIVELU, 1999; MACEIRA et al., 1997 e RHA et al., 2001).

8- Caracterização físico-química das poligalacturonases puras

As poligalacturonases purificadas foram caracterizadas quanto ao pH e temperatura ótima e quanto à estabilidade a estes dois fatores.

8.1- Efeito do pH sobre a atividade das enzimas puras

Com relação à influência do pH na atividade da poligalacturonase produzida em FES, nota-se que o pico de atividade está na faixa de pH entre 4,5 e 5,5. Em valores de pH superiores, a atividade decresceu, sendo que em pH 7,5 esta já não foi mais detectada (Fig. 16). Na PG produzida em FSM, a atividade enzimática aumentou até o pH 5,5 e, acima deste, houve uma queda acentuada na atividade enzimática, sendo que no 7,5 esta também já não foi mais detectada (Fig. 16).

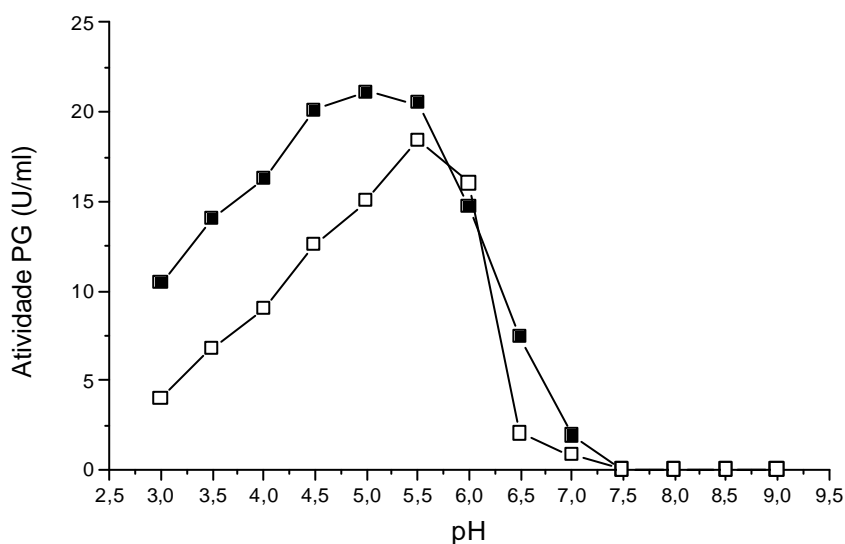


Figura 16: Efeito do pH sobre a atividade das pectinases de *Thermoascus aurantiacus* purificadas. Tampões: acetato 2,5-5,5; citrato 5,5-7,0; tris-HCl 7,0-8,5; glicina 8,5-9,5. -■- FES; -□- FSM.

As duas enzimas apresentaram, com relação ao pH ótimo de atividade, um perfil distinto ao encontrado para as enzimas brutas, conforme exposto anteriormente, no item 5.1. Nota-se que, em pH 3,0, a atividade da enzima bruta proveniente da FES foi muito menor (cerca de 25%) ao valor do pico de atividade (Fig. 8). Quando a mesma foi purificada, este valor ficou em torno de 45% (Fig. 16). Em pH 6,0, observa-se que a atividade das enzimas puras ficou bem mais próxima à obtida no pH 5,5, o mesmo não ocorrendo com as enzimas brutas, que apresentaram uma queda brusca na atividade no pH 6,0. Isso indica que alguns componentes do extrato bruto possam interferir na atividade enzimática em algumas condições de pH, sendo que quando estes foram retirados durante os processos cromatográficos, a atividade aumentou.

O pH ótimo apresentado pelas poligalacturonases purificadas do fungo *T. aurantiacus* no presente trabalho é similar ao encontrado para várias PGs fúngicas purificadas. Segundo JAYANI et al. (2005), a maioria das poligalacturonases, obtidas de diferentes fontes microbianas, apresentam pH ótimo na faixa entre 3,5 e 5,5.

CABANE e DONÈCHE (2002) relataram a purificação de duas poligalacturonases do fungo *Botrytis cinerea*, ambas com pH ótimo de 4,5, mesmo valor encontrado para a poligalacturonase purificada de uma linhagem do fungo *Rhizopus oryzae* (SAITO et al., 2004). Resultado similar foi descrito por MOHAMED et al. (2003), que purificaram duas PGs do fungo *Trichoderma reesei*, as quais apresentaram pH ótimo de 4,5 (PG I) e 4,2 (PG II).

ISSHIKI et al. (2000) purificaram e caracterizaram uma exo-PG, que apresentou pH ótimo 5,0. NITURE e PANT (2004) descreveram a purificação e caracterização de uma PG do fungo *Fusarium moniliforme*, que apresentou pH ótimo 5,3. YAO et al. (1996) relataram que o pH ótimo da PG purificada do fungo *Penicillium expansum* foi 5,0, mesmo valor encontrado para a poligalacturonase do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, descrito por SATHISH-KUMAR e PALANIVELU (1999).

8.2- Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas puras

Na figura 17, observa-se que a temperatura ótima para a atividade das PGs produzidas nos dois processos fermentativos foi a mesma (65°C). Porém, nos dois casos,

este valor é muito próximo ao encontrado em 60°C, podendo-se dizer que a temperatura ótima para ambas está faixa de 60-65°C, assim como ocorreu para as enzimas brutas.

A PG obtida da FES teve a sua atividade aumentada até a temperatura de 65°C, na qual ocorreu o pico de atividade (28,0 U/mL). Em valores mais elevados de temperatura, a atividade decresceu, perdendo cerca de 75% de atividade a 75°C. A enzima obtida na FSM também mostrou um aumento na sua atividade até a temperatura de 65°C, apresentando redução gradual dessa atividade em temperaturas acima deste valor. A 75°C, a atividade foi reduzida para cerca de 45% da atividade máxima (Fig. 17).

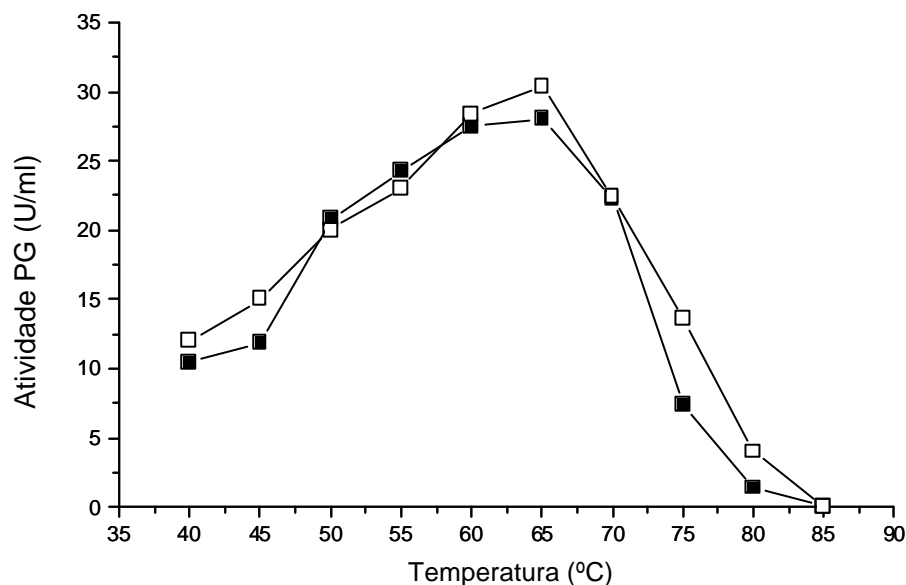


Figura 17: Efeito da temperatura sobre a atividade das pectinases de *Thermoascus aurantiacus* purificadas. -□- FES; -■- FSM.

A influência da temperatura sobre a atividade de poligalacturonases purificadas de microrganismos mesofílicos é relatada por vários autores. Geralmente estas enzimas têm temperatura ótima entre 30°C e 60°C (JAYANI et al., 2005; DE VRIES e VISSER, 2001). NITURE e PANT (2004) purificaram e caracterizaram um poligalacturonase do fungo *Fusarium moliniforme*, produzida por FES utilizando farelo de trigo e bagaço de laranja

como substrato, a qual mostrou temperatura ótima de 40°C. SAITO et al. (2004) relataram a purificação de uma PG produzida pelo fungo *Rhizopus oryzae* por FES utilizando bagaço de laranja, a qual apresentou temperatura ótima de 45°C. DEVI e RAO (1996) purificaram três PGs do fungo *Aspergillus carbonarius*, com temperaturas ótimas de 50°C (PG II) e 55°C (PG I e PG III). SAKAMOTO et al.(2002) purificaram duas exo-PGs de *Aspergillus niger*, que apresentaram temperatura ótima de 60°C

Para pectinases de fungos termofílicos, os relatos da influência da temperatura na atividade de pectinases são escassos. KAUR et al. (2004) relataram a purificação parcial e caracterização de um poligalacturonase produzida pelo fungo termofílico *Sporotrichum thermophile* em fermentação submersa, a qual apresentou temperatura ótima de 55°C. Já a enzima purificada do fungo *Acrophialophora nainiana* mostrou maior atividade a 60°C (CELESTINO et al., 2005).

8.3- Determinação da estabilidade das enzimas puras frente a variações de pH e temperatura

Após a determinação do pH e temperatura ótima de atividade da PG, foram feitos testes para se determinar a estabilidade frente à variações destes fatores, quando em ausência de substrato. A estabilidade foi determinada comparando-se com a atividade enzimática determinada no pH e temperatura ótimos de atuação, encontrada antes do tratamento.

Com relação à estabilidade ao pH, a enzima pura produzida em FES mostrou uma estabilidade de mais 80% nos pH entre 5,0 e 6,5, sendo que em valores superiores a estabilidade decresceu. Em pHs mais extremos, a estabilidade foi menor, principalmente no extremo de pH alcalino. Nos valores de pH mais ácidos (3,0-4,5), a enzima manteve cerca de 73% da atividade original, enquanto que em pH 10,0 a mesma manteve 44% e, a 10,5, a atividade caiu para 37% da original (Fig. 18).

A enzima pura obtida por FSM mostrou uma estabilidade menor em pH mais ácido (entre 3,0-4,5). No pH 4,5, a atividade foi de 32% da atividade original. Em pH 5,0 e 5,5, a mesma mostrou boa estabilidade (98% e 90%, respectivamente). Assim como

ocorreu para a enzima da FES, a estabilidade da PG pura obtida da FSM também diminuiu em valores mais elevados de pH, sendo este efeito mais acentuado nesta última (Fig. 18).

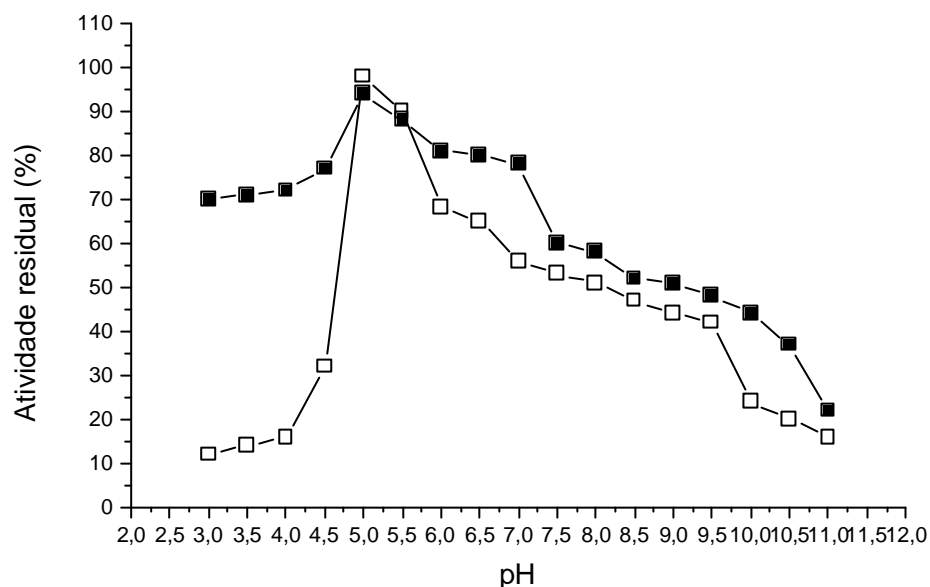


Figura 18: Estabilidade das poligalacturonases de *Thermoascus aurantiacus* purificadas, frente a variações de pH, em ausência de substrato. -■- FES; -□- FSM.

Em relação às enzimas brutas (Fig. 10), as enzimas puras apresentaram algumas diferenças quanto à estabilidade ao pH. A PG bruta obtida da FES apresentava estabilidade superior a 90% nas faixas de pH de 4,0-5,0 e 7,0-8,5. Já a enzima pura, apresentou estabilidade superior a 90% no pH 5,0, havendo uma redução gradual na estabilidade em valores mais elevados.

Para a enzima bruta da FSM, a queda da atividade foi gradual, conforme aumentava o pH. Porém, até o pH 7,5, manteve mais de 80% da atividade original. Já a enzima pura mostrou um resultado bastante diferente, uma vez que a houve maior estabilidade em pH 5,0-5,5 e em valores extremos a atividade caiu bastante, sendo assim um perfil bem distinto daquele observado para a PG bruta. Não há na literatura relatos de comparação da estabilidade ao pH entre pectinases brutas e purificadas.

Com relação a termoestabilidade, as duas poligalacturonases purificadas apresentaram um perfil muito semelhante. Quando incubadas por 1 hora, em ausência de substrato, nota-se que as PGs puras mantiveram 100% da atividade original até na temperatura de 50°C. Porém, a 60°C, as atividades caíram bruscamente, para menos de 10%. A 70°C, ambas foram totalmente desnaturadas (Fig. 19). Este resultado é similar ao encontrado por SATHISH-KUMAR e PALANIVELU (1999), que relataram que a poligalacturonase purificada do fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus* manteve apenas 4% de atividade a 60°C e, a 70°C, foi completamente inibida, quando exposta por 1 hora nestas temperaturas. Por outro lado, a termoestabilidade das PGs puras do *T. aurantiacus* é maior quando comparada com a relatada por DEVI e RAO (1996) para três PGs do fungo mesofílico *Aspergillus carbonarius*. Duas destas (PGI e PGII) foram totalmente inativadas quando expostas a 46°C por cerca de 20 e 30 minutos, respectivamente. A outra (PGIII) manteve cerca de 50% da atividade após 1 hora, nesta mesma temperatura.

Quando comparadas com as enzimas brutas (Fig. 11), nota-se que a termoestabilidade das enzimas purificadas (Fig. 19) foi menor, sendo este fato mais acentuado para a PG obtida da FES. Quando expostas por 1 hora até a temperatura de 50°C, tanto as enzimas brutas quanto as purificadas mantiveram 100% da atividade original. Porém, quando expostas a 60°C neste mesmo intervalo de tempo, a PG bruta obtida da FSM apresentava cerca de 12% da atividade original e após purificada manteve menos de 10%, enquanto que a PG bruta obtida da FES apresentava cerca de 82% da atividade original e após purificada preservou menos de 10% da atividade. Este resultado sugere que, após as etapas de purificação, algum componente do meio que proporcionava termoestabilidade às mesmas pode ter sido eliminado, fazendo diminuir a resistência anteriormente observada. Ainda pode-se sugerir que o possível componente estabilizador seja mais acentuado em FES.

Este componente pode ser algum íon metálico que permitiria a estabilidade das PGs e que foi eliminado durante a purificação. Segundo NELSON e COX (2002) a função de íons metálicos na atividade enzimática seria a de orientar o substrato para a reação ou estabilizar os estados de transição enzima-substrato carregados eletricamente. O sítio para

esta estabilização seria composto de dois resíduos de aminoácidos dispostos a certa distância e que permitiria a inserção de um íon de tamanho compatível com a mesma. Se este íon for divalente, a ligação ocorrida entre os aminoácidos e o íon é mais forte e manteria a estabilidade enzimática.

Outros fatores podem ter contribuído para a termoestabilidade das enzimas brutas, tais como a presença de sais e/ou do substrato, que podem estar relacionados com a maior estabilidade de algumas enzimas quando expostas a altas temperaturas (VIEILLE e ZEIKUS, 2001). Não há na literatura trabalhos que comparam a termoestabilidade de pectinases purificadas, obtidas de diferentes processos fermentativos. Também não há relatos comparando esta característica em uma enzima bruta e posteriormente purificada.

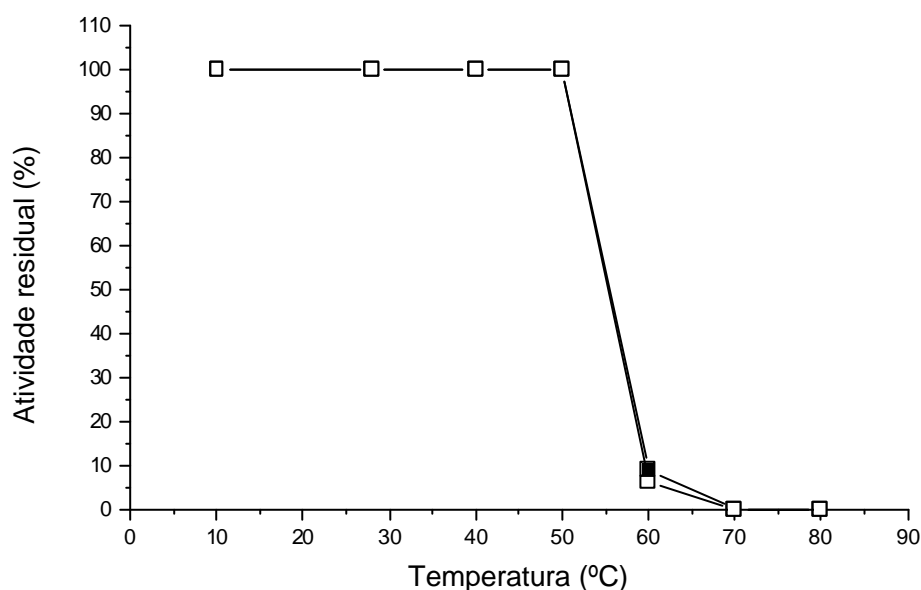


Figura 19: Estabilidade à temperatura das PGs de *T.aurantiacus* purificadas, quando incubadas por 1 hora, em diferentes temperaturas. -□- FES; -■- FSM.

Após avaliar a estabilidade em diferentes temperaturas, foi feito um teste para determinar a “meia-vida” das enzimas, a 60°C. Como pode ser observado na figura 20, os resultados confirmaram o fato de a enzima pura obtida da FES não ser mais termoestável

que a obtida da FSM, uma vez que a estabilidade a 60°C da PG proveniente da FSM foi de cerca de 10 minutos, enquanto que a da proveniente da FES foi de pouco menos que 5 minutos. Além disso, nota-se que em intervalos de tempo superiores, a PG da FSM também manteve maior atividade.

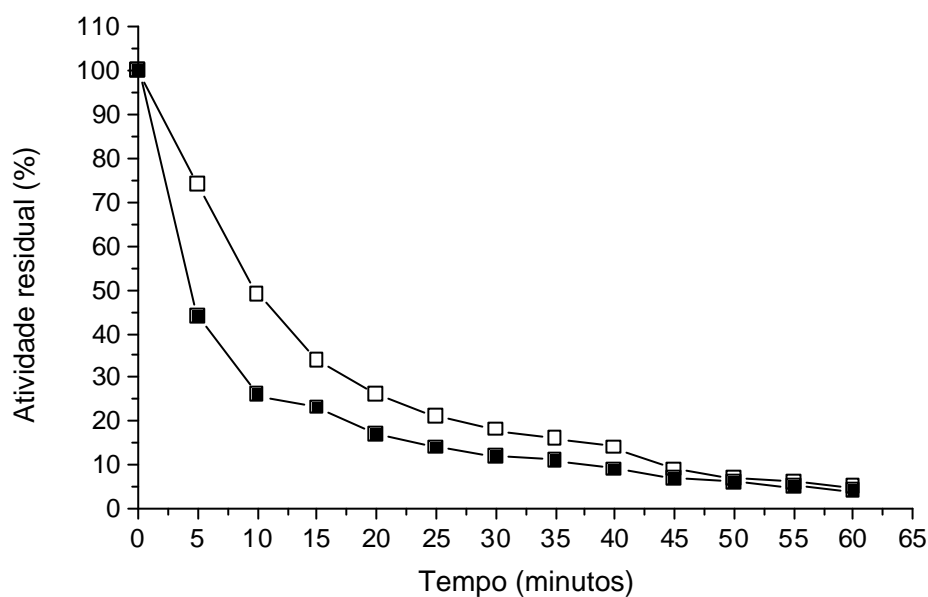


Figura 20: Tempo de estabilidade das PGs de *T. aurantiacus* purificadas, quando incubadas a 60°C em diferentes intervalos de tempo. -□- FES; -■- FSM.

A comparação da termoestabilidade das PGs purificadas do fungo *T. aurantiacus* nos dois processos fermentativos não corrobora estudos encontrados na literatura, nos quais as enzimas produzidas por FES são geralmente mais termoestáveis que as produzidas por FSM. Porém, vale ressaltar que estes estudos comparam enzimas brutas e não purificadas. No caso das PGs brutas produzidas por *T. aurantiacus*, a termoestabilidade da enzima produzida em FES também foi maior em relação à obtida em FSM, conforme discutido anteriormente.

9- Avaliação da especificidade ao substrato das poligalacturonases puras

Como pode ser observado na figura 21, as duas PGs apresentaram uma grande especificidade por pectina de citrus, principalmente na de baixa esterificação (26%), com a atividade sendo bem maior quando comparada com os outros substratos analisados. Pode-se ainda notar que este efeito foi um pouco mais acentuado na enzima purificada da FES.

Estes resultados, por um lado diferem de alguns relatos encontrados na literatura, os quais mostram preferência de algumas pectinases para o ácido poligalacturônico. Porém dentre pectinas de alta e baixa esterificação, muitas preferem a de baixa esterificação, em relação à pectina altamente esterificada, como observado para as PGs do *T. aurantiacus*.

DEVI e RAO (1996), relataram que três PGs purificadas do fungo *Aspergillus carbonarius* hidrolisaram preferencialmente o ácido poligalacturônico, quando comparado com pectina de citrus e de maçã. A endo-PG purificada de *Aspergillus kawachii* mostrou ser mais ativa em ácido poligalacturônico do que em pectina, sendo que em pectina de alta esterificação a enzima foi praticamente inativa (CONTRERAS-ESQUIVEL et al., 2004). Resultados similares foram encontrados por GADRE et al. (2003) com a endo-PG de *Mucor flavus* e por YAO et al. (1996) com a PG purificada de *Penicillium expansum*, nos quais a atividade foi mais elevada em pectina de baixa esterificação em relação à de altamente esterificada.

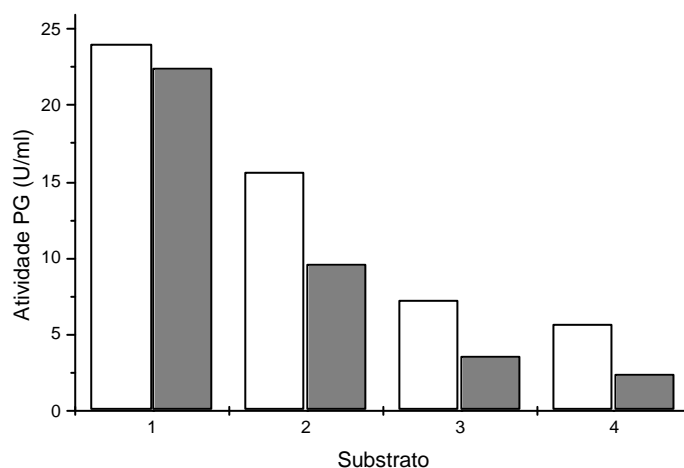


Figura 21: Especificidade ao substrato das PGs puras do fungo *T. aurantiacus*. **1-** pectina de citrus com 26% de esterificação; **2-** pectina de citrus com 92% de esterificação; **3-** pectina de maçã; **4-** ácido poligalacturônico. † FES; ? FSM.

10- Determinação do efeito de íons metálicos sobre a atividade das enzimas purificadas

O efeito de vários íons metálicos sobre a produção das PGs purificadas foi avaliado, visando determinar se alguns íons aumentam ou inibem a atividade das enzimas. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Influência de diferentes íons e do EDTA sobre a atividade das PGs purificadas.

Íon	Atividade relativa (%)	
	PG FSM	PG FES
Controle	100	100
Fe^{+3}	100	94
Ag^+	110	82
Ca^{+2}	100	94
Mg^{+2}	93	76
Mn^{+2}	25	23
Zn^{+2}	50	41
K^+	104	100
Hg^{+2}	0	0
EDTA	75	73

Conforme pode ser observado, os íons Fe^{+3} e Ca^{+2} não afetaram a atividade da enzima obtida da FSM e diminuí em apenas 6% a da obtida em FES. O íon Fe^{+3} , também a 2 mM, inibiu em 25% a atividade da PG produzida por *Fusarium oxysporum* (MACEIRA et al., 1997) e, mesmo a 1 mM, inibiu nesta mesma proporção a atividade da PG purificada

do fungo *Thermomyces lanuginosus* (SATHISH-KUMAR E PALANIVELU, 1999). Em relação ao Ca^{+2} , resultados distintos são encontrados na literatura. Para a PG produzida por *Fusarium oxysporum*, a sua presença (a 2 mM) inibiu em cerca de 50% a atividade da enzima (MACEIRA et al, 1997), enquanto que para a PG do fungo *Botrytis cinerea* este íon (a 1 mM) inibiu em 90% a atividade enzimática (CABANE e DONÈCHE, 2002). Por outro lado, a presença de Ca^{+2} , também a 1 mM, aumentou em 20% a atividade da PG produzida por *Sporotrichum thermophile* (KAUR et al., 2004).

O íon Ag^+ aumentou em 10% a atividade da PG da FSM, enquanto que a PG proveniente da FES sofreu inibição de 18%. O íon K^+ promoveu aumento da atividade da PG obtida da FSM em 4% e não provocou nenhum efeito na enzima da FES. Resultado similar foi encontrado por SATHISH-KUMAR e PALANIVELU (1999) com a poligalacturonase produzida pelo fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, a qual não sofreu efeito deste íon (porém a 1mM) na sua atividade.

Os íons Mg^{+2} , Zn^{+2} e Mn^{+2} e também o EDTA inibiram a atividade das duas enzimas, sendo este efeito um pouco mais acentuado na enzima produzida em FES. Para a da FSM, a diminuição foi de 7%, 50%, 75% e 25%, respectivamente, enquanto que para a da FES, o decréscimo foi de 24%, 59%, 77% e 27%, respectivamente. O íon Mg^{+2} (a 2mM) também inibiu em cerca de 50% a atividade da PG produzida por *Fusarium oxysporum* (MACEIRA et al, 1997). Por outro lado, a atividade da PG produzida por *Sporotrichum thermophile* foi inibida em 78% com este íon, na concentração de 1 mM (KAUR et al., 2004). Com relação ao Zn^{+2} , resultados similares são encontrados para outras PGs fúngicas, as quais também sofreram inibição quando expostas a este íon. A poligalacturonase produzida por *Thermomyces lanuginosus* foi inibida em 53% (SATHISH-KUMAR e PALANIVELU, 1999), enquanto que a produzida por *Sporotrichum thermophile* foi inibida em torno de 50% com este íon, a 1 mM (KAUR et al., 2004).

A maior inibição ocorreu quando foi utilizado Hg^{+2} , o qual inibiu totalmente a atividade das duas poligalacturonases. Este íon inibiu em 31% a atividade da PG produzida por *Fusarium oxysporum* (MACEIRA et al., 1997). Segundo os autores, a inibição por agentes bloqueadores do grupo tiol, como o HgCl_2 , sugere um possível envolvimento deste

grupo no sítio ativo da enzima. Resultados similares foram encontrados para a PG de *Sclerotinia sclerotiorum*, descritos por RIOU et al (1992). Três poligalacturonases purificadas de *Aspergillus carbonarius* também foram inibidas por este íon, mesmo em uma concentração muito baixa (0,02 mM). Neste caso, as enzimas PG I, PG II e PG III foram inibidas em 25%, 60% e 86%, respectivamente (DEVI e RAO, 1996). O efeito de íons oxidativos na estabilidade enzimática pode ser atribuído à oxidação da cisteína, que provoca a formação de pontes dissulfeto intramoleculares e intermoleculares ou a reorganização destas ligações, levando à formação de ácido sulfênico, que resulta em variações estruturais das enzimas (VIEILLE e ZEIKUS, 2001).

11- Determinação do K_m e $V_{m\acute{a}x}$.

A afinidade das enzimas puras por pectina de citrus de baixa esterificação foi analisada através do procedimento gráfico proposto por LINEWEAVER e BURK (1934), utilizando o programa GRAFIT-5. O K_m da PG obtida da FSM foi de 1,46 mg/mL e o $V_{m\acute{a}x}$ foi 2433,3 μ mol/min/mg de proteína. Já o K_m da PG obtida da FES foi de 1,58 mg/mL e o $V_{m\acute{a}x}$ foi 1553,1 μ mol/min/mg de proteína. Este resultado é similar ao encontrado por PANDA et al. (2004), que relataram que o K_m da PG produzida por *Aspergillus niger* foi de 1,377 mg/mL.

O mesmo é relativamente alto, indicando uma baixa afinidade da enzima por este substrato. No entanto, este valor está na faixa encontrada para o K_m de várias poligalacturonases. Segundo MOHAMED et al. (2003), o K_m de poligalacturonases fúngicas descritas na literatura geralmente variam de 0,12 a 6,7 mg/mL. Estes autores purificaram duas poligalacturonases do fungo *Trichoderma reesei*, que apresentaram K_m nos valores de 0,15 mg/mL (PG I) e 0,93 mg/mL (PG II). KAUR et al. (2004) purificaram uma PG do fungo *Sporotrichum thermophile*, com K_m de 0,416 mg/mL. A pectinase purificada do fungo termofílico *Acrophialophora nainiana* apresentou um K_m bem elevado (4,22 mg/mL), indicando baixa afinidade pela pectina de citrus (CELESTINO et al, 2005).

12- Focalização isoeétrica e determinação do ponto isoeétrico

O ponto isoeétrico da PG produzida em FSM foi de 7,8, enquanto que o da produzida em FES foi de 6,6. Estes valores explicam a utilização de diferentes valores de pH na troca iônica. A purificação da enzima da FSM neste processo foi feita em pH 5,0, enquanto que a da FES foi feita usando pH 4,0. No primeiro processo, o pH 5,0 já estava distante do ponto isoeétrico da enzima (7,8), enquanto que no último o ponto isoeétrico estava mais próximo (6,6). Assim, foi necessário usar um pH menor (4,0) para uma maior ligação da enzima na resina, durante a purificação desta última.

Os valores de pI das duas PGs do fungo *T. aurantiacus* são similares ao das PGs de outras linhagens fúngicas descritas na literatura. MACEIRA et al. (1997) purificaram uma PG do fungo *Fusarium oxysporum* que apresentou pI 7,0. CABANNE e DONÈCHE (2002) relataram a purificação de duas pectinases, sendo uma endo-PG com pI 7,8 e uma exo-PG com pI 8,0. NITURE e PANT (2004) descreveram a purificação de uma poligalacturonase com pI 8,6.

No entanto, esta é uma característica que varia muito entre pectinases de diferentes microrganismos e mesmo entre diferentes linhagens de uma mesma espécie fúngica. Este fato pode ser ilustrado pelos resultados encontrados por PASHKOULOV et al. (2002), que relataram a purificação e caracterização de PGs isoladas de cinco diferentes linhagens de *Botrytis cinerea*. Os autores observaram que a enzima de cada linhagem apresentou pontos isoeétricos diferentes, variando entre 5,0 e 9,0.

Valores inferiores de pI também são encontrados na literatura. CONTRERAS-ESQUIVEL e VOGET (2004) relataram a purificação de uma PG com pI 3,55. DI PIETRO e RONCERO (1996) purificaram uma exo-PG (PG2) de *Fusarium oxysporum*, a qual apresentou pI 4,5. Valor similar foi encontrado por MARTEL et al. (1998), com uma endo-PG que apresentou pI 4,8.

13- Identificação dos produtos de hidrólise

A análise dos produtos de hidrólise mostrou resultados interessantes em relação à classificação do modo de ação das duas enzimas estudadas. No cromatograma obtido, pode-se observar que as poligalacturonases, após incubadas por 10 min a 65°C, liberaram uma

mistura dos ácidos mono, di, tri e oligogalacturônicos (Fig. 22). Foi observado também que as enzimas não são capazes de hidrolisar o ácido trigalacturônico, conforme observado na figura 23.

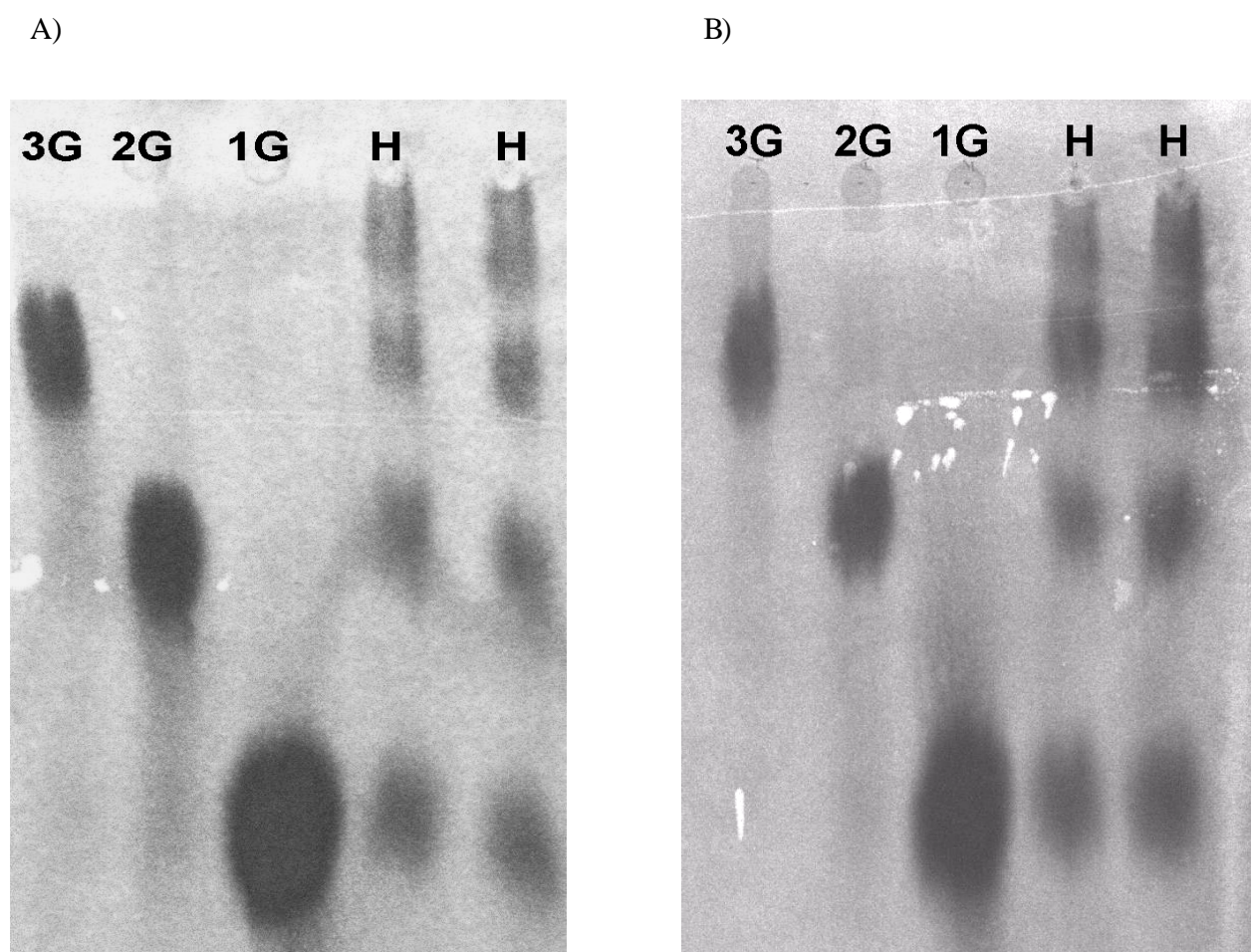


Figura 22: Produtos de hidrólise da atividade das poligalacturonases puras em pectina de citrus (2% de esterificação – Sigma), após 10 min de incubação. Os produtos foram separados em papel Whatmman. A- FSM; B- FES. 3G-ácido trigalacturônico; 2G- ácido digalacturônico; 1G- ácido galacturônico; H- hidrolisado.

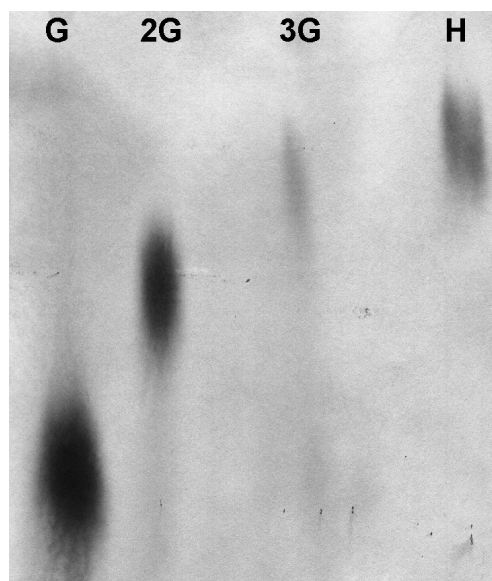


Figura 23: Produtos de hidrólise da atividade das poligalacturonases puras em ácido trigalacturônico (Sigma), após 10 min de incubação. Os produtos foram separados em papel Whatmman. 3G-ácido trigalacturônico; 2G- ácido digalacturônico; 1G- ácido galacturônico; H- hidrolisado.

Uma forma comumente empregada para determinar o modo de ação endo ou exo de uma poligalacturonase é avaliar a taxa de redução da viscosidade de uma solução de substrato, em comparação com a taxa na qual uma conhecida enzima com ação exo reduz a viscosidade deste mesmo substrato. A endo-PG atua ligando-se de forma aleatória (randômica) ao longo da sua cadeia e catalisando a hidrólise das ligações glicosídicas nestes locais, formando fragmentos que podem sofrer uma posterior clivagem de forma randômica. Este modo de clivagem produz uma mistura de oligômeros. Assim, ocorre uma queda do grau de polimerização do substrato e conseqüentemente da viscosidade da solução, muito mais rápida que aquela obtida com as enzimas com ação exo, que removem monômeros a partir das extremidades não-redutoras do substrato (COOK et al., 1999).

Os resultados obtidos para as PGs produzidas pelo fungo *T. aurantiacus* com relação aos produtos de hidrólise e a redução da viscosidade do substrato sugerem que as enzimas apresentam um mecanismo de ação misto endo/exo. As atividades específicas de endo-PG, determinadas pela redução da viscosidade do substrato, foram de 369,0 U/mg

para a enzima produzida em FSM e de 442,1 para a obtida da FES. No entanto, a hidrólise da pectina liberou como produtos de hidrólise tanto ácidos mono, di, tri e oligogalacturônicos, sugerindo então que as mesmas degradam o substrato através de ataques múltiplos na molécula do substrato.

Resultados similares foram encontrados por BIELY et al. (1996) e BENEN et al (1996) com poligalacturonases produzidas por *Aspergillus niger*. DI PIETRO e RONCERO (1996) também relataram resultado similar com uma poligalacturonase produzida por *Fusarium oxysporum*.

CONTRERAS-ESQUIVEL e VOGET (2004), observaram este mesmo modo de ataque com a poligalacturonase produzida pelo fungo *Aspergillus kawachii*. Esta PG também não foi capaz de degradar ácido digalacturônico e trigalacturônico, mas liberou ácidos mono, di, tri e oligogalacturônicos, indicando então que a mesma apresenta ação por múltiplos ataques.

Este mecanismo misto de clivagem foi primeiramente proposto para α -amilase (BAILEY E FRENCH, 1957) e foi subsequente bem caracterizado por ROBYT e FRENCH (1967) para esta enzima. Segundo os autores, para a ação enzimática em substratos poliméricos, existem três tipos distintos de mecanismos de ação: única cadeia, múltiplas cadeias e ataques múltiplos.

Na ação em única cadeia, a enzima forma um complexo enzima-substrato (E-S) ativo e catalisa a reação a partir do final da cadeia, como um “zipper” e não forma um complexo ativo com outro substrato até que termine a primeira cadeia.

O processo de múltiplas cadeias é o clássico modo de ação randômica, no qual a enzima catalisa a hidrólise de apenas uma ligação em um encontro efetivo E-S.

Já na ação por múltiplos ataques, a enzima forma um complexo enzima-polímero, no qual há uma geometria adequada para a catálise. Neste caso, a enzima pode catalisar a hidrólise de várias ligações antes de se dissociar do substrato e formar um novo complexo ativo com outras cadeias, resultando na liberação de oligogalacturonatos. O grau de múltiplo ataque pode ser definido como o número de eventos catalíticos, após o primeiro, durante o “tempo de vida” de um complexo E-S individual.

A tabela 7 resume as principais características das poligalacturonases obtidas por FES e FSM e purificadas do fungo *T. aurantiacus*.

Tabela 7: Resumo das principais características das poligalacturonases puras do fungo *T. aurantiacus*.

Característica	Processo Fermentativo	
	FES	FSM
pH ótimo	4,5-5,5	5,5
Temperatura ótima (°C)	60-65	60-65
Estabilidade ao pH	Em torno de 90% em pH 5,0-5,5	Em torno de 90% em pH 5,0-5,5
Estabilidade à temperatura	100% até 50°C	100% até 50°C
Termoestabilidade a 60°C	Cerca de 5 min.	Cerca de 10 min.
Massa molar (kDa)	29,3	30,1
Km (mg/mL)	1,58	1,46
V _{máx} (? mol/min./mg)	1553,1	2433,3
Ponto isoelétrico	6,6	7,8
Produtos de hidrólise	Ácidos mono, di, tri e oligogalacturônicos	Ácidos mono, di, tri e oligogalacturônicos

VII- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos no presente trabalho indicam que o tipo de processo fermentativo empregado para a produção de poligalacturonases pelo fungo termofílico *T. aurantiacus* não resultou na observação de diferenças marcantes entre as características das enzimas obtidas, considerando que muitas destas características foram similares entre as enzimas purificadas da fermentação submersa e da fermentação em estado sólido, tais como pH e temperatura ótimos de atividade, estabilidade ao pH, massa molar, k_m e produtos de hidrólise.

Com relação às enzimas brutas, quando se compara estas com as enzimas purificadas, observou-se algumas características similares, tais como pH e temperatura ótimos de atividade. Por outro lado, fatores como a termoestabilidade e estabilidade ao pH sofreram alteração após o processo de purificação, indicando que alguns componentes presentes no extrato bruto foram eliminados durante as etapas de purificação. Assim, estudos posteriores poderiam avaliar qual (is) componente (s) exercem função de garantir maior estabilidade a estas enzimas no seu estado bruto. Esse componente certamente confere uma característica importante a ser considerada no uso da enzima bruta do fungo *T. aurantiacus* na degradação de material vegetal.

Além disso é interessante notar o fato de que, nas condições estudadas, o fungo produziu apenas um tipo de poligalacturonase em cada processo fermentativo, o que pode ser uma peculiaridade de fungos termofílicos. Estudos com poligalacturonases de microrganismos mesofílicos relatam a produção de várias isoformas, as quais são podem ser produtos de diferentes genes ou então de modificações pós-tradução. Neste caso, a

produção de várias isoformas representaria uma adaptação dos microrganismos mesofílicos na invasão do tecido vegetal, uma vez que a produção de enzimas com características distintas permitiria a degradação de uma grande variedade de substâncias pécnicas, nas diferentes condições ambientais a que estão expostas.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho possibilitam a realização de alguns estudos posteriores, como por exemplo: a investigação dos fatores relacionados à termoestabilidade e à presença de apenas uma poligalacturonase em cada processo fermentativo, estudos de cristalização e resolução das suas estruturas e também avaliações do potencial de aplicação das enzimas brutas e purificadas em processos nos quais as pectinases são utilizadas.

VIII- CONCLUSÕES

- Dentre os substratos testados para a produção de PG FSM, a maior atividade ocorreu quando o fungo foi cultivado na água amarela, com pH inicial 5,5 e na temperatura de incubação de 45°C.

- O processo fermentativo empregado não foi responsável por grandes variações nas características das enzimas, principalmente após purificadas. A PG bruta da FES mostrou-se mais termoestável que a da FSM. Porém, quando purificadas, as duas poligalacturonases apresentaram perfis muito semelhantes. Ambas mantiveram 100% da atividade original até na temperatura de 50°C. Porém, a 60°C, a atividade caiu bruscamente, para menos de 10% da atividade original. A “meia-vida” das PGs obtidas da FES e FSM foram de cerca de 5 e 10 minutos, respectivamente.

- Nenhum íon aumentou significativamente a atividade das enzimas, nas condições estudadas.

- Ambas as enzimas apresentaram preferência por pectina de citrus de baixa esterificação, em relação à de alta esterificação, à pectina de maçã e ao ácido poligalacturônico.

- As PGs obtidas da FES e FSM apresentaram massas molares muito próximas: 30,1 kDa e 29,3 kDa, respectivamente.

- O Km das enzimas também apresentou um valor bem próximo: 1,58 mg/ml (FES) e 1,46 mg/ml (FSM).
- Os pontos isoeletricos observados para as PGs foram de 6,6 (FES) e 7,8 (FSM).
- Ambas liberam, como produtos de hidrólise da pectina de citrus, os ácidos mono, di, tri e oligogalacturônicos e não degradam o ácido trigalacturônico. A liberação destes produtos sugere que as duas enzimas apresentam um mecanismo de ação misto endo/exo.

IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-NASSER, N. H.; HELMY, S. M.; EL-GAMMAL, A. .A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi. **Polymer Degradation and Stability**, v. 55, p. 249-255, 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.

ACUÑA-ARGÜELLES, M. E.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES; E. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 808-814, 1995.

AGUILAR, G.; HUITRÓN, C. Application of fed-batch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 541-545, 1986.

AGUILAR, G.; TREJO, B. A.; GARCÍA, T. J. M.; HUITRÓN, C. Influence of pH on endo and exo-pectinase production by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 912-917, 1991.

AGUILAR, C. N.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; RODRIGUEZ, R.; PRADO, L. A.; LOERA, O. Differences in fungal enzyme productivity in submerged and solid state cultures. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, p. 109-113, 2004.

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

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.

ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E. Como purificar proteínas?. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, nº 24, p. 30-35, 2002.

ANTIER, P.; MINJARES, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid state fermentation of coffee pulp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 254-260, 1993.

AQUINO, A. C. M. M. **Purificação e determinação de propriedades bioquímicas das atividades glucoamilase e α -amilase produzidas pelo fungo termofílico *Scytalidium thermophilum* 15.1.** 2000. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada)- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

ASHOKKUMAR, B.; KAYALVIZHI, N.; GUNASEKARAN, P. Optimization of media for α -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 331-338, 2001.

BAILEY, M. J. Effect of temperature on polygalacturonase production by *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 622-624, 1990.

BAILEY, J. M.; FRENCH, D. The significance of multiple reactions in enzyme-polymer systems. **J. Biol. Chem.**, v. 226, p. 1-14, 1957.

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

BENEN, J. A. E.; KESTER, H. C. M.; VISSER, J. Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, p. 577-585, 1999.

BLANDINO, A.; DRAVILLAS, K.; CANTERO, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Utilisation of whole flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 497-503, 2001.

BOCCAS, F.; ROUSSOS, S.; GUTIERREZ-ROJAS, M.; SERRANO, L., VINIEGRA-GONZÁLEZ, 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.

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

BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência Agrotécnica**, v. 24, p. 137-152, 2000.

BRUINS, M. E.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M. Thermozyms and their applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 90, p. 155-189, 2001.

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

CABANNE, C.; DONÈCHE, B. Purification and characterization of two isozymes of polygalacturonase from *Botrytis cinerea*. **Microbiological Research**, v. 157, p. 1-7, 2002.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Trad. Henrique Bunselmeyer Ferreira et al., 3 ed., Porto Alegre: Ed. Artmed, 2000.

CANNEL, E.; MOO-YOUNG, M. Solid-state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v. 6, p. 2-7, 1980.

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

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

CELESTINO, S. M. C.; FREITAS, S. M.; MEDRANO, F. J.; DE SOUZA, M. V.; FERREIRA FILHO, E. X. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana*, **Journal of Biotechnology**, 2005 (in press- disponível no site www.elsevier.com/locate/jbiotec).

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

CONESA, A.; PUNT, P. J.; VAN LUIJK, N.; VAN DEN HONDEL, A. M. J. J. The secretion pathway in filamentous fungi: A biotechnological view. **Fungal Genetics and Biology**, v. 33, p. 155-171, 2001.

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

COOK, B. J.; CLAY, R. P.; BERGMANN, C. W.; ALBERSHEIM, P.; DARVILL, A. G. Fungal polygalacturonases exhibit different substrate degradation patterns and differ in their susceptibilities to polygalacturonase-inhibiting proteins. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, p. 703-711, 1999.

COURI, S.; TERZI, S. C.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, S. P.; COSTA, A. C. A. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 255-261, 2000.

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

DEUTSCHER, M. P. Guide to protein purification. **Methods in Enzymology**, v. 182, 984 p., 1990.

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.

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

DI PIETRO, A.; RONCERO, M. I. G. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 145, 295-299, 1996.

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

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.

GADRE, R. V.; VAN DRIESSCHE, G.; VAN BEEUMEN, J. V.; BHAT, M. K. Purification, characterization and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. v. 32, p. 321-330, 2003.

GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KAPANTAI, M.; KALANTZI, O. Growth conditions of *Aspergillus* sp ATHUM-3482 for polygalacturonase production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 425-429, 1997.

GARZÓN, C. G.; HOURS, R. A. Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. **Bioresource Technology**, v. 39, p. 93-95, 1992.

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

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

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

HO, P. L.; KHITARA, E.; OGAWA, D. M. O.; SILVA, A. R. B. P.; RAMOS, C. R. R.; NASCIMENTO, A. L. T. O. A arte de purificar proteínas: Uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico. **Biotecnologia**, v. 13, p. 24-26, 2000.

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

HOURS, R. A.; VOGET, C. E.; ERTOLA, R. J. Apple pomace as raw material for pectinases production in solid state culture. **Biological Wastes**, v. 23, p. 221-228, 1988.

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

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

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, 2005 (in press - disponível no www.sciencedirect.com).

JECU, L. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. **Industrial Crops and Products**, v. 11, p. 1-5, 2000.

KAPOOR, M.; BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; HOONDAL, G. S. Production and partial purification and characterization of a thermo-alkalizable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 467-473, 2000.

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

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial 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 Technology**, v. 94, p. 239-243, 2004.

KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus sojae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 242-243, 1995.

KOBAYASHI, T.; HIGAKI, N.; SUZUMATSU, A.; SAWADA, K.; HAGIHARA, H.; KAWAI, S.; ITO, S. Purification and properties of a high-molecular-weight, alkaline exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 70-75, 2001.

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

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

LARIOS, G.; GARCIA, J. M.; HUITRON, C. Endo-polygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus sp* CH-Y-1043. **Biotechnology Letters**, v. 11, p. 729-734, 1989.

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.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, p. 658-666, 1934.

MACEIRA, F. I. G.; DI PIETRO, A.; RONCERO, I. G. Purification and characterization of a novel exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. **FESM Microbiology**, v. 154, p. 37-43, 1997.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**, Prentice Hall International Inc., New York, 8^a Ed., 1998.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BATH, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 461-488, 2000.

MALDONADO, M. C.; NAVARRO, A.; CALLIERI, D. A. S. Production of pectinases by *Aspergillus* sp using differently pretreated lemon peel as the carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 501-504, 1986.

MALDONADO, M. C.; STRASSER DE SAAD, A. M. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.34-38, 1998.

MARTEL, M. B.; LÉTOUBLON, R.; FÉVRE, M. Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 158, p. 133-138, 1998.

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

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

MARTINS, E. S. **Produção de enzimas pectinolíticas pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação em estado sólido utilizando resíduos agro-industriais**. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

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

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.

MINUSSI, R. C.; SOARES-RAMOS, J. R. L.; COELHO, J. L. C.; SILVA, D. O. Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 246-250, 1998.

MOHAMED, S. A.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; MIKKELSEN, J. D. New polygalacturonases from *Trichoderma reesei*: characterization and their specificities to partially methylated and acetylated pectins. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 515-524, 2003.

NITURE, S. K.; PANT, A. Purification and biochemical characterization of poligalacturonase II produced in semi-solid medium from a strain of *Fusarium moliniforme*. **Microbiological Research**, v. 159, p. 305-314, 2004.

OOIJKAAS, L. P.; WEBER, F. J.; BUITELAAR, R. M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. **TIB Technology**, v. 18, p. 356-360, 2000.

PANDEY, A. Recent developments in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 109-117, 1992.

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, 2000a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000b.

PASHKOULOV, D.; GIANNETTI, I.; BENVENUTO, E.; DE MARTINS, D. Biochemical characterization of polygalacturonases from five different isolates of *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, v. 7, p. 827-831, 2002.

PATIL, S. R.; DAYANAND, A. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, 2005 (in press - disponível no www.sciencedirect.com).

PELCZAR, J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, v. I, São Paulo: ed. Makron Books, 524 p., 1996.

PESSOA-JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. 1 ed., Barueri /SP: ed. Manole Ltda, 456 p., 2005.

PUCHART, V.; KATAPODIS, P.; BIELY, P.; KREMnickÝ, A.; BHAT, M. K. Production of xylanases, mannanases and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p.355-361, 1999.

RABALHO, A. A. **Isolamento de linhagens microbianas amilolíticas termofílicas: produção, caracterização e aplicação da enzima bruta na hidrólise do amido de mandioca**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

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

RIOU, C.; FREYSSINER, G.; FEVRE, M. Purification and characterization of an extracellular pectinolytic enzymes produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 58, p. 578-583, 1992.

RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of a thermostable extracellular α -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 156-160, 2001.

ROBYT, J. F.; FRENCH, D. Multiple attack hypothesis of α -amilase action: action of porcine pancreatic, human salivary, and *Aspergillus oryzae* α -amilases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 122, p. 8-16, 1967.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**, 2005 (in press – disponível no www.sciencedirect.com).

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. **Process Biochemistry**, p. 9-13, 1978.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. **Pectic enzymes**. In: Microbial Enzymes and Bioconversions, v. 5, p. 227-282, ed. A. H. Rose. Academic Press, London, 1980.

SAKAMOTO, T.; BONNIN, E.; QUEMENER, B.; THIBAUT, J. F. Purification and characterisation of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1-9, 2002.

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

SAPUNOVA, L. I.; LOBANOK, A. G.; MIKHAILOVA, R. V. Conditions of synthesis of pectinases and proteases by *Aspergillus alliaceus* and production of a complex macerating preparation. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 33, p. 257-260, 1997.

SATHISH-KUMAR, S.; PALANIVELU, P. Production and properties of pectinolytic enzymes from the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 781-782, 1998.

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

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

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.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and

agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 318-324, 2002.

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

SINGH, S. A.; PLATTNER, H.; DIEKMANN, H. Exopolygalacturonate lyase from a thermophilic *Bacillus* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 420-425, 1999.

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, 1999.

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

SOLEHAH, A.; BALAUMANI, V. T.; DAS, K.; AMIZA, M. A. Enzymes for improved extraction and stabilization of colour and flavour of orange juice. **Journal of Food and Science Technology**, v. 31, p. 508-510, 1994.

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

SREEKANTIAH, K. R.; JALEEL, S. A.; NARAYANA RAO, D.; RAGHAVENDRA RAO, M. R. Pectinolytic enzymes produced by *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom. **European Journal of Applied Microbiology**, v. 2, p. 173-181, 1975.

SREENATH, H. K.; SANTHANAM, K. The use of commercial enzymes in white grape juice clarification. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 73, p. 241-243, 1992.

TAKAO, M.; NAKANIWA, T.; YOSHIKAWA, K.; TERASHITA, T.; SAKAI, T. Purification and characterization of thermostable pectate lyase with protopectinase activity from thermophilic *Bacillus* sp TS47. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 2360-2367, 2000.

TARAGANO, V. M.; PILOSOFF, A. M. R. Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 411-419, 1999.

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

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

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Reviews: Thermozyms: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. **TIB Technology**, v. 14, p. 183-190, 1996.

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.

VOET, D. **Fundamentos de Bioquímica** / Donald Voet, Judith G. Voet e Charlotte W. Pratt; trad. Arthur Germano Fett Neto et al., Porto Alegre, Ed. Artmed, 2000.

VOGEL, H. F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implication. **American Naturalist**, v. 98, p. 435-446, 1964.

WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. Ellis Horwood Ltd John Wiley & Sons (Ed), p. 148, 1975.

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

YAO, C.; CONWAY, W. C.; SAMS, C. E. Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* in apple fruit. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 86, p. 1160-1166, 1996.

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