

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

*“Produção, Purificação e  
Caracterização do Complexo  
Pectinolítico do Fungo *Aspergillus  
niveus*”*

*Alexandre Maller*

Ribeirão Preto/SP  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

*“Produção, Purificação e  
Caracterização do Complexo  
Pectinolítico do Fungo *Aspergillus  
niveus*”*

*Alexandre Maller*

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto da USP, como  
parte das exigências para obtenção do título de  
Mestre em Ciências, Área: Bioquímica.

*Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli*

Ribeirão Preto/SP  
2008

## *DEDICATÓRIA*

Aos meus pais, Marlene e Armando, pelo apoio e carinho em toda minha vida e principalmente durante esse período onde várias fronteiras foram rompidas. Devo não somente esse trabalho a vocês, mas toda minha história.

À minha linda Ana Claudia, pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão  
dedicados desde nosso primeiro encontro.

À Prof. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli, pela valorosa orientação e amizade, contribuindo não somente para minha formação profissional, mas também pessoal.

## *AGRADECIMENTOS*

Estes humildes agradecimentos são dedicados àqueles que estiveram ao meu lado, me apoiando na vida profissional e pessoal, tanto na bancada, quando nos congressos ou numa mesa de bar. Os últimos aqui citados me são tão especiais quanto os primeiros.

Agradeço a Deus por infinitos motivos, principalmente pelo dom da vida e pelo refúgio a todo o momento;

Aos meus pais, Marlene e Armando, pela motivação e carinho.

Ao meu irmão Adriano, pelo especial apoio computacional.

À Ana Claudia, minha querida namorada, e sua família, por todo amor e carinho e por ficarem ao meu lado me apoiando nos momentos difíceis.

À Prof. Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli, pela oportunidade e excepcional orientação.

Ao Professores Dr. João Atílio Jorge, Dr. Hector Francisco Terenzi e Dr. Luis Henrique pela colaboração e apoio.

À Prof. Dra. I. Y. Hirata pelo seqüenciamento.

Às amigas Prof. Dra. Clarice Aoki Osaku e Prof. Dra. Marina Kimiko Kadowaki, seus ensinamentos ficarão pela vida toda me guiando.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo suporte técnico e financeiro.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pelo local onde foi desenvolvido a pesquisa.

Aos Técnicos Ricardo (eterno Fessor) e Maurício, pela colaboração e disponibilidade. Ricardo um exemplo de amizade e companheirismo.

Aos amigos de República William, André, Tony e Gustavo, as histórias que ficaram serão inesquecíveis.

Em especial aos grandes amigos William e André, nossos bons e maus momentos nos fizeram crescer cada vez mais! Tenho certeza que nossos caminhos continuarão lado a lado por muito tempo.

Aos companheiros de laboratório Simone, Michele, Vivian, Jorge, Altino, Victor, Allan, Ana, Juliana, Cynthia, Tati, Marita, Vanessa, Priscila, Jean, Fabrício, Alexandre, Vanessa, Alana, Marielle, Monica e Tida, pela convivência amigável, colaboração e momentos de descontração.

Um especial agradecimento à Simone e Michele pela grande ajuda, sanando todas as minhas dúvidas que surgiram durante a pesquisa.

Ao Jão, pela amizade e descontração, e Juliano pela amizade e disponibilidade.

Aos agregados da república por todos os momentos felizes.

À Ivone pela disponibilidade e paciência em responder a todas nossas dúvidas.

A todos os Professores que me ajudaram com dedicação em minha formação durante minha vida acadêmica.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*Amigo é coisa pra se guardar no lado esquerdo do peito...*

## *A Ciência e Deus*

Um senhor de 70 anos viajava de trem tendo ao seu lado um jovem universitário, que lia o seu livro de ciências. O senhor, por sua vez, lia um livro de capa preta. Foi quando o jovem percebeu que se tratava da Bíblia, e que estava aberta no livro de Marcos. Sem muita cerimônia o jovem interrompeu a leitura do velho e perguntou:

- O senhor ainda acredita neste livro cheio de fábulas e crendices?

- Sim, mas não é um livro de crendices. É a Palavra de Deus. Estou errado?

- Mas é claro que está! Creio que o senhor deveria estudar a História Universal. Veria que a Revolução Francesa, ocorrida há mais de 100 anos, mostrou a miopia da religião. Somente pessoas sem cultura ainda crêem que Deus tenha criado o mundo em seis dias. O senhor deveria conhecer um pouco mais sobre o que os nossos cientistas pensam e dizem sobre tudo isso.

- É mesmo? E o que pensam e dizem os nossos cientistas sobre a Bíblia?

- Bem, respondeu o universitário, como vou descer na próxima estação, falta-me tempo agora, mas deixe o seu cartão que eu lhe enviarei o material pelo correio com a máxima urgência. O velho então, cuidadosamente, abriu o bolso interno do paletó e deu o seu cartão ao universitário. Quando o jovem leu o que estava escrito, saiu cabisbaixo sentindo-se pior que uma ameba.

No cartão estava escrito: "Professor Doutor Louis Pasteur, Diretor Geral do Instituto de Pesquisas Científicas da Universidade Nacional de França".

O fato ocorreu em 1892. É verdadeiro e integrante da sua biografia.

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima."

(Louis Pasteur)

## SUMÁRIO

	<b>Lista de Figuras</b> .....	i
	<b>Lista de Tabelas</b> .....	iii
	<b>Abreviaturas</b> .....	iv
	<b>Resumo</b> .....	v
	<b>Summary</b> .....	vii
<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1	Estrutura da pectina.....	4
1.2	O complexo enzimático.....	7
1.3	Purificação de pectinases.....	12
1.4	Aplicação enzimática.....	14
1.5	Os fungos.....	18
<b>2</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>20</b>
<b>3</b>	<b>Material e Métodos</b> .....	<b>21</b>
3.1	Microrganismos utilizados.....	21
3.2	Manutenção das linhagens em laboratório.....	21
3.3	Obtenção das culturas em meio líquido.....	21
3.4	Extração das enzimas intracelulares e extracelulares do meio líquido .....	27
3.5	Obtenção das culturas em meio sólido e extração das enzimas extracelulares.....	27
3.6	Dosagens enzimáticas.....	28
3.6.1	Dosagem da atividade poligalacturonase pelo método D.N.S.	28
3.6.2	Dosagem da pectina liase.....	29

3.7	Cinética enzimática.....	29
3.8	Determinação de proteínas e outros métodos analíticos.....	30
3.9	Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática.....	30
3.10	Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas.....	30
3.11	Efeito do pH sobre a atividade pectinolítica.....	31
3.12	Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas pectinolítica...	31
3.13	Determinação do efeito de íons sobre a atividade da poligalacturonase.....	31
3.14	Purificação das poligalacturonases extracelulares.....	32
3.15	Caracterização enzimática em gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	32
3.16	Determinação da massa molecular da PGPI.....	34
3.17	Identificação dos produtos de hidrólise.....	35
3.18	Determinação do ponto isoelétrico.....	35
3.19	Determinação do conteúdo de carboidratos.....	36
3.20	Estudo cinético da poligalacturonase purificada.....	36
3.21	Sequenciamento da PGPI.....	36
3.22	Efeito de solventes orgânicos na atividade da PGGPI.....	37
3.23	Repetibilidade dos ensaios.....	37
4	<b>Resultados</b> .....	38
4.1	Seleção de microrganismos pectinolíticos.....	38
4.2	Crescimento e produção pectinolítica do <i>A. niveus</i> em função do tempo de cultivo.....	40
4.3	Efeito da concentração de inóculo sobre a produção de pectinases e para crescimento de <i>A. niveus</i> .....	42
4.4	Efeito de fontes de carbono.....	44

4.5	Efeito da concentração da fonte de carbono para a produção de pectinases e para o crescimento do <i>Aspergillus niveus</i> .....	47
4.6	Avaliação de diferentes fontes de carbono sobre a produção de pectinases por <i>A. niveus</i> em meio substrato sólido.....	49
4.7	Efeito do pH inicial de meio de cultivo sobre a produção de pectinases por <i>A. niveus</i> .....	52
4.8	Efeito da temperatura no ensaio enzimático da poligalacturonase.....	53
4.9	Estabilidade térmica da poligalacturonase nos ensaios enzimáticos.....	54
4.10	Efeito do pH no ensaio enzimático da poligalacturonase.....	56
4.11	Estabilidade ao pH da poligalacturonase.....	57
4.12	Efeito da adição de íons à mistura de reação, sobre a atividade da poligalacturonase.....	58
4.13	Efeito da temperatura no ensaio enzimático de pectina liase..	59
4.14	Estabilidade térmica no ensaio enzimático para pectina liase.	60
4.15	Purificação das poligalacturonases extracelulares.....	61
4.16	Critério de pureza.....	64
4.17	Determinação da massa molecular da PGPI.....	65
4.18	Identificação dos produtos de hidrólise da PGPI em cromatografia de sílica em camada delgada.....	68
4.19	Efeito da temperatura sobre o ensaio enzimático da PGPI.....	69
4.20	Estabilidade térmica da PGPI nos ensaios enzimáticos.....	70
4.21	Efeito do ph sobre o ensaio enzimático da PGPI.....	71
4.22	Estabilidade ao pH da PGPI.....	72
4.23	Estudo cinético da PGPI.....	73
4.24	Efeito da adição de íons à mistura de reação, sobre a atividade da PGPI.....	74
4.25	Determinação do conteúdo de carboidratos.....	75

4.26	Determinação do ponto isoelétrico.....	75
4.27	Sequenciamento da PGPI.....	75
4.28	Efeito de solventes orgânicos na atividade da PGPI.....	77
5	<b>Discussão</b> .....	78
6	<b>Referências bibliográficas</b> .....	89

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1	A estrutura básica da pectina.....	5
FIGURA 2	Os diferentes tipos de substâncias pécticas e de suas correspondentes pectinases.....	9
FIGURA 3	Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação na estrutura química das substancias pécticas.....	11
FIGURA 4	Ciclo de vida de <i>Aspergillus nidulans</i> .....	19
FIGURA 5	Crescimento e atividade de poligalacturonase produzida por <i>A. niveus</i> em função do tempo.....	41
FIGURA 6	Determinação de pectina liase produzida por <i>A. niveus</i> em função do tempo.....	41
FIGURA 7	Efeito da concentração de inóculo sobre a produção de pectinases e para crescimento de <i>A. niveus</i> .....	43
FIGURA 8	Efeito da concentração da fonte de carbono para a produção de pectinases e para o crescimento do <i>Aspergillus niveus</i> .....	48
FIGURA 9	Efeito do pH inicial de meio de cultivo sobre a produção das enzimas.....	52
FIGURA 10	Efeito da temperatura para poligalacturonases produzidas por <i>A. niveus</i> .....	53
FIGURA 11	Estabilidade térmica da poligalacturonase em diferentes temperaturas na ausência de substratos.....	55
FIGURA 12	Estabilidade térmica da poligalacturonase em função do tempo de incubação na ausência de substratos.....	55
FIGURA 13	Influência do pH na atividade da poligalacturonase produzida por <i>A. niveus</i> .....	56
FIGURA 14	Estabilidade ao pH da poligalacturonase de <i>A. niveus</i> .....	57
FIGURA 15	Efeito da temperatura para pectina liase produzida por <i>A. niveus</i> .....	59
FIGURA 16	Estabilidade térmica da pectina liase em função da temperatura de incubação.....	60
FIGURA 17	Perfil da poligalacturonase em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose.....	62

FIGURA 18	Perfil das poligalacturonases em coluna de gel-filtração Biogel P-100.....	63
FIGURA 19	Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% pH 8,3 das poligalacturonases.....	64
FIGURA 20	Atividade da PGPI em PAGE 12% pH 8,3. ....	65
FIGURA 21	Determinação da massa molecular da PGPI em SDS-PAGE.	66
FIGURA 22	Determinação da massa molecular da PGPI em FPLC.....	67
FIGURA 23	Produtos de hidrólise da enzima PGPI em diferentes tempos.	68
FIGURA 24	Efeito da temperatura para PGPI produzida por <i>A. niveus</i> .....	69
FIGURA 25	Estabilidade térmica da PGPI em diferentes temperaturas e em função do tempo de incubação na ausência de substratos.....	70
FIGURA 26	Influência do pH na atividade da PGPI purificada de <i>A. niveus</i> .....	71
FIGURA 27	Estabilidade ao pH da PGPI de <i>A. niveus</i> .....	72
FIGURA 28	Projeção de Hanes.....	73
FIGURA 29	Seqüência de aminoácidos de <i>Aspergillus fumigatus</i> ; <i>Neosartorya fischeri</i> ; <i>Aspergillus terreus</i> ; e <i>Aspergillus niger</i> mostrando os pontos de homologia com a PGPI de <i>Aspergillus niveus</i> .....	76

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1	Crescimento e atividade poligalacturonásica intra e extracelulares usando diferentes meios.....	39
TABELA 2	Crescimento de <i>A. niveus</i> e produção de poligalacturonases em meio Czapeck suplementado com fontes de carbono variadas.....	45
TABELA 3	Crescimento de <i>A. niveus</i> e produção de pectina liase em meio Czapeck suplementado com fontes de carbono variadas.....	46
TABELA 4	Avaliação de diferentes fontes de carbono sobre a produção de pectinases por <i>A. niveus</i> em meio substrato sólido.....	50
TABELA 5	Comparação na produção de poligalacturonases por <i>A. niveus</i> cultivado em meio substrato sólido e em meio líquido de Czapeck, suplementados com diferentes fontes de carbono.....	51
TABELA 6	Efeito da adição de íons e EDTA à mistura de reação, sobre a atividade da poligalacturonase bruta.....	58
TABELA 7	Passos da purificação de poligalacturonase de <i>A. niveus</i> .....	63
TABELA 8	Constantes cinéticas aparentes da poligalacturonase.....	73
TABELA 9	Efeito da adição de íons, na mistura de reação, sobre a atividade da PGPI.....	74
TABELA 10	Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática da PGPI.....	77

## ABREVIATURAS

<b>AceA</b>	Ácido acérico	<b>PAE</b>	Pectina acetilesterase
<b>Api</b>	Apiose	<b>PAGE</b>	Eletrofose em gel de poliacrilamida
<b>Ara</b>	Arabinose	<b>PE</b>	Pectinesterase
<b>Dha</b>	Ácido deoxilixo-heptulopiranosilárico	<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>Di</b>	Digalacturônico	<b>PGL</b>	Poligalacturonato liase
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido	<b>PGPI</b>	Poligalacturonase pico I
<b>DNS</b>	Ácido 3',5' dinitrosalicílico	<b>PGPII</b>	Poligalacturonase pico II
<b>FPLC</b>	Fast Protein Liquid Chromatography	<b>pl</b>	Ponto isoelétrico
<b>Fuc</b>	Fucose	<b>PL</b>	Pectina liase
<b>Gal</b>	Galactose	<b>PME</b>	Pectina metilesterase
<b>GalA</b>	Ácido galacturônico	<b>PMG</b>	Polimetilgalacturonase
<b>g-glob</b>	Gama-globulina	<b>PMGL</b>	Polimetilgalacturonato liase
<b>GlcA</b>	Ácido glucurônico	<b>RGI</b>	Ramnogalacturonana I
<b>HG</b>	Homogalacturonana	<b>RGII</b>	Ramnogalacturonana II
<b>M</b>	Marcador	<b>Rha</b>	Ramnose
<b>Mioglob</b>	Mioglobulina	<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>Mo</b>	Monogalacturônico	<b>Tri</b>	Trigalacturônico
<b>OLG</b>	Oligogalacturonídeo liase	<b>U</b>	Unidade enzimática
<b>Ovalb</b>	Ovalbumina	<b>Xyl</b>	Xilose

## RESUMO

Pectina é o maior componente da parede celular de plantas. Esses polissacarídeos podem ser degradados por enzimas pécnicas, nomeadas, pectinases. Podem ser classificadas, baseado em seu mecanismo de degradação, em enzimas desesterificantes e despolimerizantes. Pectinases são importantes enzimas industriais, utilizadas principalmente para aumentar a eficiência de filtração e clarificação de sucos de frutos, na maceração, liquefação e extração de tecidos vegetais, mas podem ser responsáveis pela patogênese em plantas. São amplamente produzidas por vários fungos filamentosos, como *Aspergillus sp.* O objetivo deste trabalho foi estudar a produção do sistema pectinolítico do *Aspergillus niveus*, purificação e caracterização bioquímica das poligalacturonases.

Depois do “screening” entre alguns fungos filamentosos, o *A. niveus* foi o microrganismo selecionado devido aos altos níveis de enzimáticos produzidos, especialmente poligalacturonases, e a pouca informação sobre esta enzima deste fungo na literatura. Poligalacturonases são secretadas principalmente a partir do 2º e 3º dia de cultivo sob agitação, mas em maior quantidade no 9º dia em regime estacionário. As condições padrões de cultura submersa foram com meio Czapeck, inoculado com  $5 \times 10^4$  esporos/mL, pH inicial 6,0, sob agitação, por 48 horas. As melhores fontes de carbono foram diferentes tipos de pectinas (especialmente 2,0% de pectina 8003 CPKelco), acompanhada por casca de laranja e maracujá. Em relação à fermentação em substrato sólido, a melhor produção ocorreu com pectina caramelizada Vetec® e casca de limão. Poligalacturonases brutas apresentaram excelente estabilidade a 60°C, por 90 minutos, e em pH ácido. Esta atividade foi 96% inibida por 10mM de  $Hg^{++}$  e 77% por  $Cu^{++}$ . Em contrapartida, 1mM  $Mn^{++}$  e

EDTA aumentaram a atividade 17% e 10%, respectivamente. A temperatura ótima da pectina liase bruta foi 55°C.

Duas poligalacturonases (PGPI e PGPII) foram caracterizadas utilizando processos cromatográficos. PGPI foi purificada, utilizando coluna de DEAE-celulose, seguida de Biogel P100, com fator de purificação de 17 vezes. A purificação foi confirmada por SDS-PAGE, onde foi observado homogeneidade eletroforética. PGPII apresentou duas bandas em SDS-PAGE e não foi caracterizada. A massa molecular da PGPI foi 123 kDa por SDS-PAGE, mas 102kDa por coluna Bio-Sil-Sec-400, com 0,7x30cm, em FPLC BioRad model 2800-Solvent Delivery System. A enzima possui 37,7% de conteúdo de carboidrato e ponto isoelétrico de 5,4. O produto final formado pela ação da PGPI em polipectato de sódio foi somente ácido monogalacturônico, sendo desta maneira classificada como uma exopoligalacturonase. Sua temperatura ótima e pH foram em torno de 50°C e numa faixa de 4,0 – 6,5, respectivamente. Apresentou alta estabilidade térmica acima de 50°C e foi extremamente estável numa faixa de pH 4,0 – 8,0, por 24 horas. A enzima foi ativada por  $Mn^{++}$ ,  $F^-$  e  $K^+$  e inibida por  $Pb^{++}$  e  $Ba^{++}$ . O  $K_m$  foi 6,7mg/mL e  $V_{max}$  de 230U/mg. Ainda, a PGPI possui homologia com exopoligalacturomases de *Aspergillus fumigatus* e *Neosartorya fischeri*. A atividade não foi afetada por tolueno, n-hexano, benzeno e éter etílico, mas foi inibida por formaldeído e isopropanol.

Estes resultados mostram o potencial desta enzima para aplicação industrial quando se utiliza diferentes pHs ou solventes orgânicos em processos de produção, como na indústria de sucos e bebidas ou na extração de produtos naturais de plantas.

## SUMMARY

Pectin is one of the major components of the cell walls of plants. This polysaccharide can be degraded by pectin enzymes, called, pectinases. They may be classified into de-esterification and depolymerising enzymes based on the degradation mechanism. Pectinases are important industrial enzymes mainly used for increasing filtration efficiency and clarification of fruit juices, in maceration, liquefaction, extraction of vegetable tissues but they are also responsible for plant pathogenesis. They are mainly produced by several filamentous fungi, as *Aspergillus sp.* The aim of this work was to study the production of the pectolytic system from *Aspergillus niveus*, purification and biochemical characterization of polygalacturonases.

After screening among some filamentous fungi, the *A. niveus* was the microorganism selected due to the high enzymatic levels, especially polygalacturonases, and the little reporting about this enzyme from this fungus. Polygalacturonases were secreted mostly from the 2nd and 3rd days on culture medium under agitation, but in larger quantity of polygalacturonases in the 9th day in static conditions. Standard conditions of the submerged cultures were Czapeck medium, inoculated with  $5 \times 10^4$  spores/mL, initial pH 6.0, under agitation, for 48h. The best carbon sources were different types of pectins (especially 2.0% pectin 8003 CPKelco), followed by orange and passion fruit peel. Regarding the solid fermentation the best production occurred with caramelized pectin Vetec<sup>®</sup> and lemon peel. Crude polygalacturonases showed excellent stability at 60°C, for 90min as well as in acid pH. This activity was 96% inhibited by 10mM Hg<sup>++</sup> and 77% by 10mM Cu<sup>++</sup>. In contrast, 1mM Mn<sup>++</sup> and EDTA increased 17% and 10% polygalacturonase activity, respectively. The optimal temperature of crude pectin lyase was 55°C.

Two polygalacturonases (PGPI and PGPII) were characterized by chromatography process. PGPI was purified by DEAE-cellulose, followed by Biogel P100 columns, obtaining a 17-fold purification factor. The purification was confirmed by 10% SDS-PAGE, where was observed electrophoretic homogeneity. PGPII showed two bands in SDS-PAGE and it was not characterized. The PGPI molecular mass was 123kDa determined by SDS-PAGE but 102kDa by Bio-Sil-Sec-400 FPLC BioRad. The enzyme had 37.7% carbohydrate content and isoelectric point of 5.4. The end product formed by action of PGPI on sodium polypectate was only monogalacturonic acid, being thus classified as an exopolygalacturonase. Optimal temperature and pH was around 50°C and in the range 4.0-6.5, respectively. It presented high thermostability up to 50°C and it was extremely stable in the range pH 4.0 – 8.0, for 24 hs. The enzyme was activated by  $Mn^{++}$ ,  $F^-$  and  $K^+$  and inhibited by  $Pb^{++}$  and  $Ba^{++}$ . The  $K_m$  was 6,7mg/mL and  $V_{max}$  of 230U/mg. The PGPI have homology with exopolygalacturonases of *Aspergillus fumigatus* and *Neosartorya fischeri*. The activity was not affected by toluene, n-hexane, benzene and ether-ethyl, but it was inhibited by formaldehyde and isopropanol.

These results show the potential of this enzyme for industrial application, when different pHs or solvent are used in the processes, as in the juice industry and beverage or in the extraction of natural products.

## 1 INTRODUÇÃO

As enzimas são substâncias naturais envolvidas em todos os processos bioquímicos que ocorrem nas células vivas. A maioria delas são proteínas, as quais consistem em cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas. Servem para catalisar reações bioquímicas, o que significa que aumentam a velocidade da reação bioquímica sem se deixar afetar pela mesma. As enzimas são capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores (amido em açúcar, por exemplo), de catalisar alterações estruturais dentro de uma molécula (caso da isomerização da glicose em frutose), assim como podem ajudar a construir moléculas específicas (de material celular, por exemplo).

Desde a Antigüidade, o homem explora involuntariamente as enzimas para produzir alimentos e bebidas, como o pão, o queijo, a cerveja e o vinho, através da fermentação natural. Inicialmente o cientista Von Liebig pensou que a fermentação resultasse de um processo químico comum, no qual os fermentos fossem materiais não vivos. No entanto, Pasteur estava convencido de que a fermentação só ocorreria na presença de organismos viáveis. Assim, ficou demonstrado, em 1897, que compostos sem vida provenientes de células de levedura viva eram os responsáveis pelos processos de fermentação. Esse fato provou que nenhum deles estava totalmente certo. Foi-se, então, gradativamente substituindo o termo “fermento” pelo termo atual, “enzima”, que significa “na levedura”, uma vez que, no início, se encontraram esses compostos em células de levedura. Posteriormente, em 1926, James Summer isolou e cristalizou urease e postulou que enzimas eram proteínas, conceito revisto depois da descoberta das ribozimas recentemente. Logo depois, em 1930, John Northrop e Moses Kunitz cristalizaram a pepsina e a tripsina, concluindo também que elas eram proteínas (NELSON & COX, 2002). A seguir,

centenas de enzimas foram classificadas, purificadas e isoladas, além da descoberta das ribozimas.

A pesquisa de atividade de polissacaridases começou nos anos 50, devido ao enorme potencial para converter lignocelulose, uma abundante e renovável fonte de energia da Terra, em glicose e açúcares solúveis. As pesquisas básicas e aplicadas durante os anos 70 e 80 demonstraram que estas enzimas induzidas para bioconversão de lignocelulose em açúcares solúveis era muito difícil e não economicamente viável. No entanto, pesquisas posteriores de celulasas, hemicelulasas e pectinases revelaram seu potencial biotecnológico em várias indústrias, incluindo alimentos, uva e vinho, ração animal, têxtil e limpeza, polpas e papel, agricultura, tanto na pesquisa quanto no desenvolvimento.

Atualmente, as enzimas são comumente utilizadas em várias aplicações industriais, e a demanda para aumentar a estabilidade, atividade e especificidade destas cresce rapidamente. Foi estimado que em 1995 a venda mundial de enzimas industriais superava 1.0 bilhão de dólares e, com o passar do tempo acredita-se que o mercado das enzimas industriais chegasse aos 1.7 e 2.0 bilhões em 2005. Neste contexto, 60% do total de enzimas industriais fornecidas mundialmente são produzidas na Europa, os restantes 40% nos EUA e Japão. Além disso, aproximadamente 75% destas enzimas são hidrolases, com as carbohidrolases formando o segundo grande grupo. Pectinases foram usadas na indústria de ração nos anos 30. Durante as duas décadas seguintes, o uso de celulasas, hemicelulasas e pectinases cresceu consideravelmente, especialmente na indústrias têxtil, de ração, uva e vinho assim como produção de polpa e papel. Hoje, estas enzimas somam aproximadamente 20% do mercado mundial de enzimas, a maioria produzida por *Trichoderma* e *Aspergillus* (BHAT, 2000).

A matéria prima, no caso a diversidade de vida, recentemente, passou a ter maior valor de mercado e maior atenção dos países detentores, o que aliado a crescente consciência da valoração da biodiversidade, fez com que regras fossem estabelecidas para a sua exploração. Surgiu em âmbito internacional uma nova forma de exploração de recursos naturais biológicos, ou seja, a exploração da biodiversidade, surgindo então a bioprospecção. Bioprospecção pode ser definida como o método ou forma de localizar, avaliar e explorar sistemática e legalmente a diversidade de vida existente em determinado local e tem como objetivo principal a busca de recursos genéticos e bioquímicos para fins comerciais (SANTOS, 2001).

Os fungos são um grupo importante de organismos, conhecendo-se mais de 77.000 espécies, a maioria das quais, terrestres. Muitos fungos da nossa biodiversidade ainda não foram estudados, embora sejam microrganismos biodegradadores naturais, que encontram as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento na natureza, na forma de macromoléculas, as quais precisam ser degradadas em unidades monoméricas, antes de serem incorporadas ao nível celular. Entre esses compostos, estão os polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, lignina, lipídeos e outros.

Os microrganismos transportam nutrientes através da membrana plasmática como compostos de baixa massa molecular. Para tal, eles secretam exoenzimas, as quais hidrolisam as macromoléculas até atingir a forma e a solubilidade necessária para que sejam transportadas pela membrana (PUTZKE & PUTZKE, 2002). Entre estas enzimas encontram-se as amilases, pectinases, xilanases, celulases e proteases, importantes para diversos processos com promissoras aplicações industriais.

## 1.1 ESTRUTURA DA PECTINA

A pectina possui um alto valor como alimento funcional extensamente utilizada como um agente gelificador e estabilizante. Também é um componente abundante, onipresente e multifuncional da parede celular de todas as plantas terrestres. Os pesquisadores de alimentos e pesquisadores de plantas, compartilham uma meta para melhor entender a estrutura e função, ao nível molecular, de polímeros pécticos.

Todas as pectinas são ricas em ácido galacturônico (GalA), acreditando que a pectina deva consistir em pelo menos 65% GalA. Como mostrado na Figura 1, três polissacarídeos pécticos (homogalacturonana, ramnogalacturonana-I e galacturonanas substituídas) foram isolados da parede primária de células e estruturalmente caracterizados (RIDLEY *et al.*, 2001), todos contendo GalA com uma extensão maior ou menor. Homogalacturonana (HG) é um polímero linear consistindo de ligações 1,4  $\alpha$ -D-GalA, enquanto ramnogalacturonana I (RGI) consiste no dissacarídeo repetido  $[1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-D-GalA-(1}\rightarrow2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow4]$  para que uma variedade de diferentes cadeias de gliconas (principalmente arabinana e galactana) fiquem presas aos resíduos de Rha. A ramnogalacturonana II (RGII) tem uma cadeia principal de HG melhor que RG, com as cadeias laterais complexas unidas aos resíduos de GalA (WILLATS, 2006).

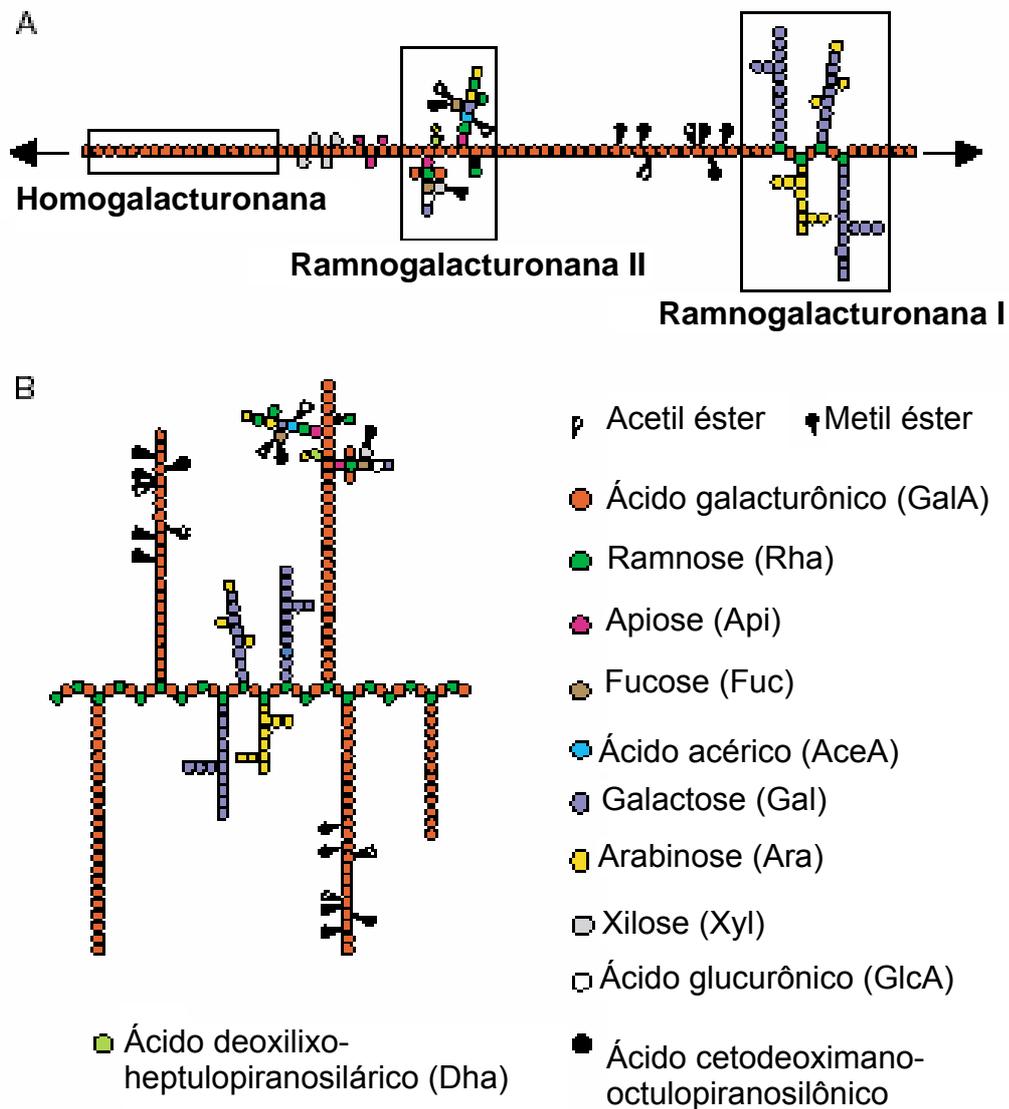


Figura 1: A estrutura básica da pectina. Representações esquemáticas convencional (A) e da estrutura recentemente proposta (B) para pectina. É importante notar que os polímeros mostrados aqui pretendem ilustrar somente alguns dos principais domínios encontrados na maioria das estruturas mais definidas de pectinas. (WILLATS, 2006).

Os sítios de ligação da molécula de pectina consistem em L-ramnose, arabinose, galactose e xilose. Os grupos carboxil do ácido galacturônico são parcialmente esterificados por grupos metil e parcialmente neutralizados por íons sódio, potássio ou amônio. Baseado no tipo de modificações das ligações da cadeia

principal, substâncias pécticas são classificadas em protopectinas, ácido péctico, ácido pectínico e pectina.

- **Protopectinas** são semelhantes às substâncias pécticas e sofrem hidrólise restrita resultando em pectina e pectinas ácidas. Protopectina é um termo usado ocasionalmente para descrever as substâncias pécticas insolúveis em água encontradas em tecidos de plantas e são utilizadas para produzir substâncias pécticas solúveis.
- **Ácidos pécticos** são galacturonanas contendo pequena quantidade de grupos metoxil. Sais de ácidos pécticos são chamados de pectatos.
- **Ácidos pectínicos** são galacturonanas com vários montantes de grupos metoxil. Possuem a propriedade de formar um gel com açúcares e ácidos ou com certos outros compostos.
- **Pectina** é um nome genérico para a mistura de diferentes compostos onde o ácido pectínico é o maior componente. Sua forma nativa está localizada na parede celular e pode estar interligada com outros polissacarídeos estruturais e proteínas para formar a protopectina insolúvel (KASHYAP *et al.*, 2000).

O caráter ácido da pectina é regulado pela pectina metilesterase e está relacionado com a tolerância ao  $Al^{3+}$  (SCHMOHL *et al.*, 2000). O termo pectina cobre um grupo de heteropolissacarídeos ácidos com domínios estruturais distintos que estão sujeitos às modificações biossintéticas baseadas na parede celular. Estes polissacarídeos parecem estar ligados para dar forma a uma rede péctica por toda a parede celular e, possivelmente, por toda a planta. A rede péctica está claramente envolvida em uma escala de funções que relacionam-se à fisiologia, ao crescimento, ao desenvolvimento e à defesa.

A variedade estrutural e a natureza dinâmica da rede péctica refletem a escala das propriedades que fornece sinais para a matriz da parede celular (nos termos mecânicos, iônicos e de hidratação), além de potencial para interações moleculares e capacidade de ser degradada pela planta e por pectinases microbianas. Portanto, a modulação da estrutura péctica pode ser vista como um ajuste fino das condições e da capacidade dentro da matriz da parede celular que fornece ambas, as propriedades mecânicas e um ambiente adequado para as atividades de enzimas modificadoras da parede celular e de outros fatores. (WILLATS *et al*, 2001)

## 1.2 O COMPLEXO ENZIMÁTICO

Pectinases, ou enzimas pectinolíticas, são produzidas por um grande número de bactérias, leveduras e fungos, insetos, nematódeos e plantas (WHITAKER, 1991), a fim de degradar (para obter fonte de carbono) ou para modificar (fruto em amadurecimento) o heteropolissacarídeo pectina. A biodegradação eficiente da pectina requer uma larga escala de enzimas, como ilustrado nas Figuras 2 e 3, incluindo tanto as que agem na cadeia principal como as que agem nas cadeias laterais. (VRIES *et al.*, 2002).

As enzimas pécticas podem ser divididas em protopectinases, pectinesterases e enzimas despolimerizantes.

- **Protopectinases:** Estas enzimas solubilizam protopectina formando pectina solúvel altamente polimerizada.
- **Pectinesterases (PE):** catalisa a desesterificação do grupo metil da pectina formando ácido pectico. A enzima atua preferencialmente no grupo metil éster da unidade galacturonato próximo a uma unidade galacturonato não esterificada.

- **Enzimas Despolimerizantes:** são subdivididas em hidrolizantes de ligações glicosídicas e clivantes.
  - **Hidrolizantes de Ligações Glicosídicas:** nestas incluem:
    - a. **Polimetilgalacturonases (PMG):** catalisam a clivagem hidrolítica da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 da pectina. Estas são subdivididas em *endo-PMG* (EC 3.2.1.15), que causa clivagem randomica da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 da pectina, preferencialmente, na pectina altamente esterificada e *exo-PMG* (EC 3.2.1.15), que causa clivagem sequencial da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 da pectina na extremidade não redutora da cadeia da pectina.
    - b. **Poligalacturonases (PG):** catalisam a hidrólise da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 do ácido péctico (ácido poligalaturônico). Elas são classificadas em *endo-PG* (EC 3.2.1.15), que catalisa a hidrólise randomica da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 do ácido péctico e *exo-PG* (EC 3.2.1.67), que catalisa a hidrólise sequencial da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 do ácido péctico na extremidade não redutora da cadeia.
  - **Clivantes:** clivam a ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 por trans-eliminação, resultando em galacturonídeo com um ligação insaturada no C4 e C5 na extremidade não redutora do ácido galacturônico formado. Nestas incluem:
    - a. **Polimetilgalacturonato Liase (PMGL, EC 4.2.2.10):** catalisa a quebra da pectina por clivagem trans-eliminativa. São classificadas em *endo-PMGL*, que catalisa a clivagem randomica da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 da pectina e *exo-PMGL*, que catalisa a quebra seqüencial da pectina por transeliminação na extremidade da cadeia.
    - b. **Poligalacturonato Liase (PGL):** catalisa a clivagem da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 do ácido péctico por trans-eliminação. São divididas em *endo-PGL*

(EC 4.2.2.2), que catalisa a clivagem aleatória da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 do ácido pécico e *exo-PGL* (EC 4.2.2.9), que catalisa a clivagem seqüencial da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 do ácido pécico na extremidade da cadeia (KASHYAP *et al.*, 2000).

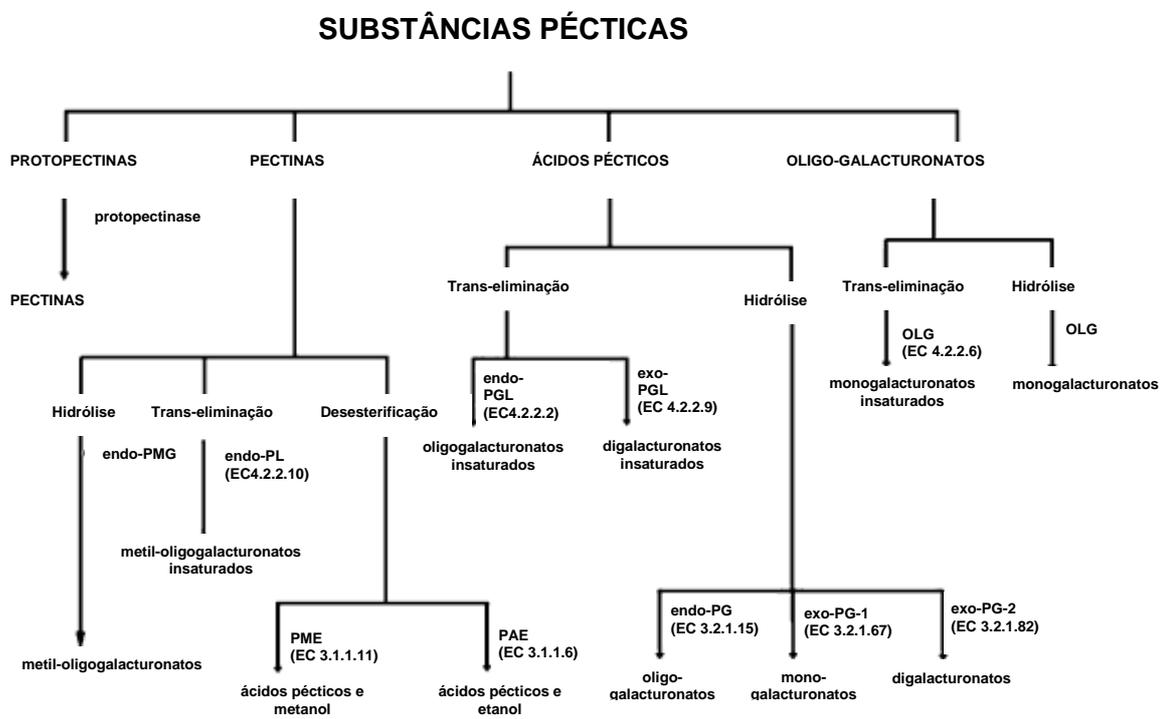


FIGURA 2: Os diferentes tipos de substâncias pécicas e de suas correspondentes pectinases. Endopectinases clivam a cadeia de forma aleatória enquanto as exopectinases clivam no final da cadeia. (PMG) polimetilgalacturonase; (PL) pectina liase, (PGL) poligalacturonato liase; (PG) poligalacturonases; (PME) pectina metilesterase; (PAE) pectina acetilesterase; (OLG) oligogalacturonídeo liase (adaptado de GUMMADI & KUMAR, 2005).

As poligalacturonases podem ser divididas em 3 grupos:

- i. as endopoligalacturonases, que atacam randomicamente as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 das cadeias polissacarídicas produzindo um número de oligômeros de ácidos galacturônicos;
- ii. exopoligalacturonase tipo I (galacturonana 1,4- $\alpha$ -galacturonosidase), que hidrolisa ácidos D-galacturônico do terminal não redutor;
- iii. exopoligalacturonase tipo II (exo-poli- $\alpha$ -galacturonosidase), que libera digalacturonato do terminal não redutor do ácido poligalacturônico.

Endopoligalacturonases e exopoligalacturonases do tipo I foram identificadas em fungos. Somente duas exopoligalacturonases do tipo II foram isoladas até agora da bactéria *Erwinia chrysanthemi*, cepa EC16 e 3937 (HE & COLLMER, 1990; SHEVCHIK *et al*, 1999).

Pectinases apresentam diferentes especificidades por substratos, mas basicamente podem ser separadas em um grupo de homogalacturonana e um grupo de ramnogalacturonana. *Aspergillus niger* produz várias enzimas ativas sobre a homogalacturonana, parte da molécula da pectina, que incluem pectina metil e acetilesterase (EC 3.1.1.11 e EC 3.1.1.6), endopoligalacturonase (EC 3.2.1.15), exopoligalacturonase (EC 3.2.1.67), pectato liase (EC 4.2.2.2) e pectina liase (EC 4.2.2.10). Enquanto a pectina liase pode utilizar o substrato metilesterificado que ocorre naturalmente, a atividade de pectina metilesterase é requerida a fim de produzir pectinas com baixo grau de grupos metil esterificados (pectatos), o substrato para as poligalacturonases e pectato liase.

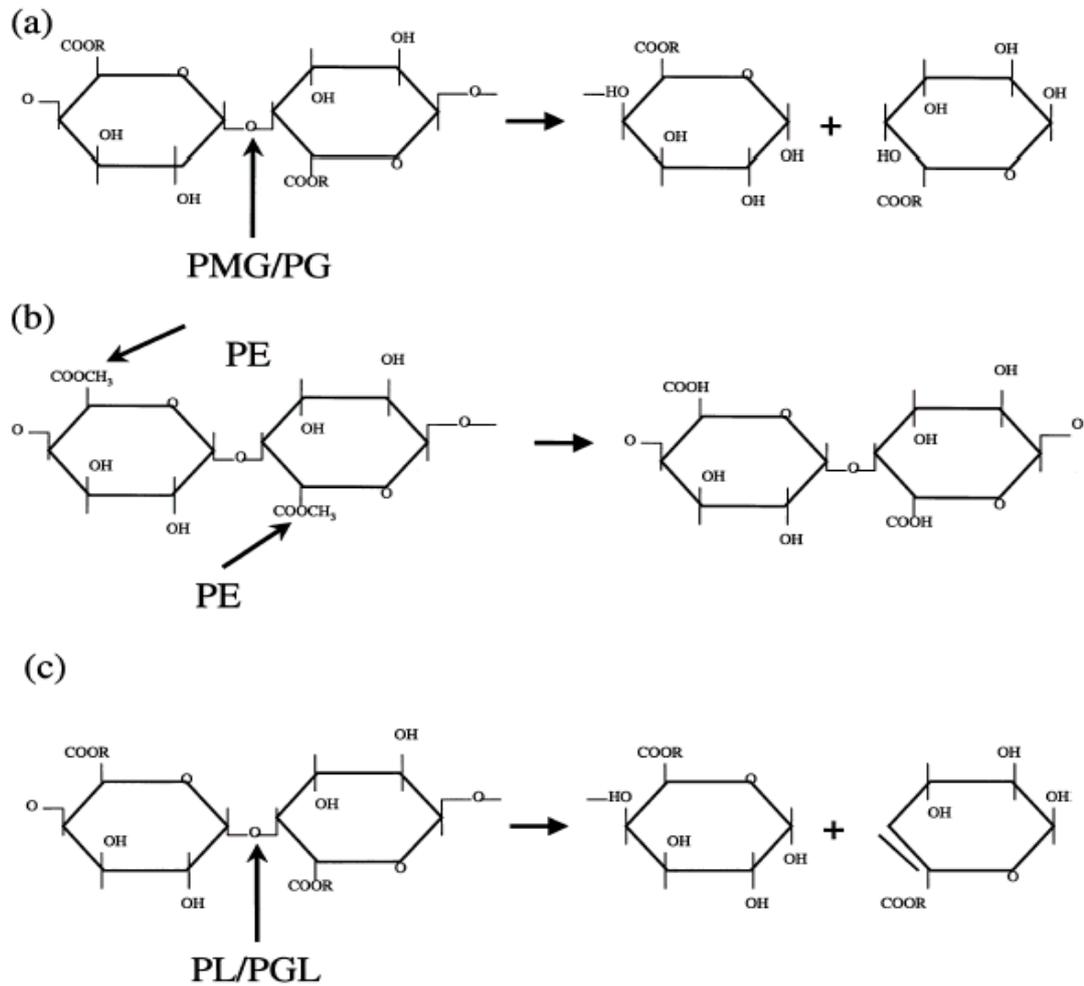


FIGURA 3: Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação na estrutura química das substâncias pécnicas. (a) Radical H para PG e CH<sub>3</sub> para PMG; (b) PE e (C) Radical H para PGL e CH<sub>3</sub> para PL. As flechas indicam os locais onde as pectinases atuam nas substâncias pécnicas. PMG: polimetilgalacturonse, PGL: poligalacturonato liase, PG: poligalacturonase (EC 3.2.1 15), PE: pectinesterase (EC 3.1.1 11), PL: pectina liase (4.2.2 10) (GUMMADI & PANDA, 2003).

Poligalacturonases possuem domínios com cerca de 8 a 10 voltas de folhas  $\beta$ -paralelas com regiões de duas curvas, formando um túnel para a ligação do substrato. A seqüência conservada indica que o sítio ativo da poligalacturonase é composto por dois aminoácidos conservados, aspartato e lisina no seu centro, que

atuam como resíduos catalíticos. Argininas e lisinas dão um potencial eletrostático no qual se ligam os substratos. Em algumas das enzimas, uma histidina perto do sítio ativo atua influenciando a eficiência catalítica. O aspartato conservado é claro candidato para atuar como base catalítica e doador de próton no mecanismo enzimático (PICKERSGILL *et al.*, 1998).

### 1.3 PURIFICAÇÃO DE PECTINASES

Durante o estudo de uma enzima, a fim de aumentar sua estabilidade, atividade e especificidade, torna-se necessário sua purificação. A otimização de um protocolo de purificação envolve muita experimentação do tipo tentativa e erro, mesmo quando se conhecem as características físico-químicas da proteína a ser purificada e muitas vezes é imprevisível seu comportamento no decorrer do processo de purificação. O grande desafio destes processo 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 & 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 liberadas para o meio de cultura. Este é um sistema cada vez mais usado para a obtenção de grandes quantidades de proteínas em solução aquosa. O passo seguinte consiste na clarificação da amostra, sendo que esta etapa representa um grande problema, especialmente para purificações em 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.*, 2000; PESSOA & KILIKILIAN, 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: eficiência do processo, viabilidade econômica e tipo de aplicação final do produto (HO *et al.*, 2000).

Durante um processo de purificação, deve-se levar em consideração também as características dos contaminantes presentes no extrato bruto e não apenas das características da proteína de interesse. A linha geral a ser seguida pode ser dividida em três fases principais: 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, 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 (DEUTSCHER, 1990, *appud* MARTINS, 2006). Para esse fim, existem várias metodologias que podem ser empregadas, como as colunas cromatográficas, que podem promover o fracionamento proteico utilizando-se de diferentes características das moléculas, como diferenças de cargas, tamanho, afinidade de ligação e outras propriedades (NELSON & COX, 2002). Diferentes métodos já foram descritos para purificar as pectinases, sendo o mais comum a eluição em coluna de troca-iônica seguida de gel-filtração, como empregado por MARQUES *et al.*, (2006).

Para se atestar a pureza final da proteína, podem ser usadas várias técnicas que apresentam sensibilidades distintas, sendo que 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 (MARTINS *et al.*, 2006).

A purificação e o avanço do conhecimento sobre as propriedades bioquímicas das pectinases são essenciais para pesquisas relacionadas ao seu modo de ação e para uma aplicação industrial mais eficiente. Na literatura, vários trabalhos são encontrados sobre produção e aplicações biotecnológicas destas enzimas. Entretanto, são escassos os títulos referentes à purificação e propriedades bioquímicas de pectinases purificadas (GUMMADI & PANDA, 2003).

#### **1.4 APLICAÇÃO ENZIMÁTICA**

As enzimas foram descobertas na segunda metade do século 19, e desde então foram usadas extensivamente em diversos processos industriais. As enzimas são biocatalizadores extremamente eficientes e altamente específicos. Com o avanço da biotecnologia nas últimas três décadas, especialmente na área da genética e de engenharia de proteínas, as enzimas encontraram seu caminho em muitos processos industriais novos. As enzimas microbianas são usadas rotineiramente em muitos setores industriais ambientalmente favoráveis e econômicos. A poluição ambiental não é mais tão aceita como inevitável na sociedade moderna.

No século passado, houve um grande aumento na consciência dos efeitos da poluição, e a pressão pública influenciou a indústria e o governo. Em virtude disso, está aumentando a demanda para substituir alguns processos químicos tradicionais em processos biotecnológicos que envolvem microrganismos e enzimas, como

pectinases, xilanases, celulases,  $\alpha$ -galactosidase, lacases e ligninases, que não somente forneçam alternativas econômicas, mas que também sejam mais ambientalmente viáveis (HOONDAL, 2002).

As enzimas são amplamente usadas no processamento de alimentos e em muitos outros ramos da indústria manufatureira. Muitos produtos alimentícios consumidos diariamente, entre os quais o pão e o queijo, são feitos com a colaboração desse tipo especial de proteína. Como suplemento de ração animal, desempenham importante papel por reduzirem a produção de resíduos. Também se empregam em muitas atividades industriais, como na indústria de produtos de limpeza, no processamento da polpa e do papel, na preparação têxtil e em aplicações médicas onde, com freqüência, substituem compostos ou processos químicos.

Neste sentido, em muitos segmentos as enzimas podem substituir substâncias químicas sintéticas e contribuir para técnicas de produção ou gerar benefícios para o meio ambiente, por meio da biodegradabilidade e pelo menor consumo de energia. Elas são mais específicas em sua ação do que as substâncias químicas sintéticas. Outra grande vantagem em se aplicar enzimas em processos industriais seria pela sua alta especificidade e eficiência e por se fazer necessário apenas pequenas quantidades do composto. Além disso, muitas vezes contribuem para uma produção mais sustentável, reduzindo o volume de resíduos gerados e o consumo de energia.

As enzimas termoestáveis, de maneira geral, apresentam vantagens para a aplicação na indústria, visto que processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas têm o risco de contaminação por microrganismos mesófilos, que são a maioria em um ambiente industrial. Por outro lado, as temperaturas mais elevadas

favorecem a solubilidade de substratos e produtos, e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos. Ainda, as enzimas extracelulares constituem importante modelo para entendimento dos mecanismos de termoestabilidade e de atividade em altas temperaturas, os quais são usados nos processos de engenharia de proteínas. Outra característica das enzimas termoestáveis é sua maior resistência à ação de proteases, uma vez que, quanto mais rígida for a molécula, menos expõe seu sítio de proteólise. A maior resistência à desnaturação por alguns solventes orgânicos também tem sido relatada como uma propriedade das proteínas termoestáveis (GOMES *et al.*, 2007).

As pectinases microbianas possuem grande potencial para oferecer a humanidade e têm importância significativa na era biotecnológica atual, devido a suas variadas aplicações, como na extração e clarificação de suco de frutas, processamento do algodão, degumação de fibras de plantas, tratamento de água, extração de óleo vegetal, chá e fermentação de café, clareamento de papel, como aditivo em ração de aves e em indústrias de bebidas alcoólicas e de alimentos (JAYANI *et al.*, 2005).

Em relação a alguns destes processos, o uso de temperaturas elevadas durante a produção de suco e outros produtos vegetais são etapas importantes dos segmentos industriais e têm diversas finalidades. Na maceração da uva para extração de suco, a incubação a 60–65°C promove a plasmólise da membrana e rupturas na parede celular do fruto, facilitando a liberação do líquido e de antocianinas responsáveis pela cor do suco. Na extração de sucos de uva para produção de vinhos, a fruta macerada é tratada a 80°C para, além de facilitar a maceração, desnaturar oxidases que causam perda da cor do vinho durante a estocagem. Na extração do “pulp wash”, a polpa da laranja (mistura de polpa e

semente), resultante do peneiramento do suco de primeira, é aquecida a 90°C para desnaturar a pectinesterase da fruta, que causa problemas de coagulação da pectina. Além das funções citadas, o tratamento térmico ainda tem por finalidade a pasteurização dos sucos e mostos, visando à redução da microbiota contaminante, principalmente de leveduras. Em todos esses processos citados, o material submetido ao aquecimento precisa ser posteriormente resfriado a 50°C para tratamento com pectinases comerciais (GOMES *et al.*, 2007).

Em relação ao pH, o trabalho na utilização de pectinases alcalinas permanece pouco desenvolvido, no qual somente alguns relatos estão disponíveis para aplicações destas enzimas. As pectinases alcalinas estão sendo utilizadas para o pré-tratamento de água residual das indústrias de alimento, de processando vegetal, que contêm material péctico, e para processar e degomar fibras de plantas, tais como o rami, o cânhamo, o linho e a juta. Estas fibras são geralmente usadas para fazer cordas, sacos, redes etc. em países desenvolvidos. Neste sentido, há uma grande necessidade de reunir informações detalhadas das pectinases alcalinas microbianas relacionadas aos potenciais de aplicações industriais, que ditarão por sua vez o sentido da pesquisa destas enzimas (HOONDAL *et al.*, 2002).

Por outro lado, as pectinases ácidas são utilizadas freqüentemente na indústria de sucos de frutas e fabricação de vinho, tendo como fonte o *Aspergillus niger*. Os processos industriais incluem: clareamento de sucos (maçã, pêssego e uva) e obtenção de sucos concentrados (sucos cítricos, de tomate e néctar). Como exemplos podemos citar a preparação de saladas de frutas cítricas, manufatura da maçã, fabricação de sidras, processo de fabricação de sucos e néctar de pêra, morango, laranja, limão e várias outras frutas como a uva e também no processamento do vinho. Além da recuperação de óleos da casca de frutas, como

terpenos, sesquiterpenos e flavonóides, assim como álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas e fenóis; maceração do tecido de plantas, liquefação e sacarificação da biomassa e isolamento de protoplasma para manipulações genéticas. As pectinases alcalinas são usadas principalmente na retirada da fibra e pré-tratamento de sucos de frutas industriais, porém estas enzimas são obtidas na maioria das vezes de fontes bacterianas. Outros exemplos de aplicação seriam na produção de papel japonês, fabricação de papel, extração de óleos (ex: canola) e fermentação de café e chás (KASHYAP *et al.*, 2000).

## 1.5 OS FUNGOS

Entre os diferentes grupos de fungos conhecidos, dois merecem destaque, sendo os que abrigam o maior número de espécies: Basidiomicetes e Ascomicetes. Neste último são encontrados os representantes do gênero *Aspergillus*. Estudos indicam que a divergência entre esses dois grupos oscila de 309 milhões de anos (BERBEE & TAYLOR, 1993) a 1,2 bilhões de anos atrás (HECKMAN, 2001). Os ascomicetos, de forma geral, apresentam tanto ciclo sexual como assexual, sendo característica a presença de uma estrutura reprodutiva denominada asco, na qual são formados os ascósporos (esporos sexuais). Embora o fungo *A. nidulans* não seja o objeto desse estudo, seu ciclo pode exemplificar o ciclo de vida do gênero *Aspergillus*, como na Figura 4, porém nem todos os *Aspergillus* apresentam ciclo parasexual.

Além disso, muitos fungos filamentosos podem ser utilizados na indústria alimentícia, para degradação de carboidratos. Um exemplo é o emprego desses microrganismos em empresas que utilizam inulinases. Os fungos são utilizados para otimizar processos de hidrólise para produção de álcool, acetona e butanol. Muitas

espécies de *Aspergillus* são descritas na literatura, como *A. niveus*, *A. aureus*, *A. fischeri*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. awamori*, *A. candidus*, *A. niger*, *A. oryzae* e *A. versicolor* (SOUZA-MOTTA *et al.*, 2005). O *Aspergillus niveus* possui especial interesse de estudo pelo seu alto potencial biotecnológico na produção de polissacaridases.

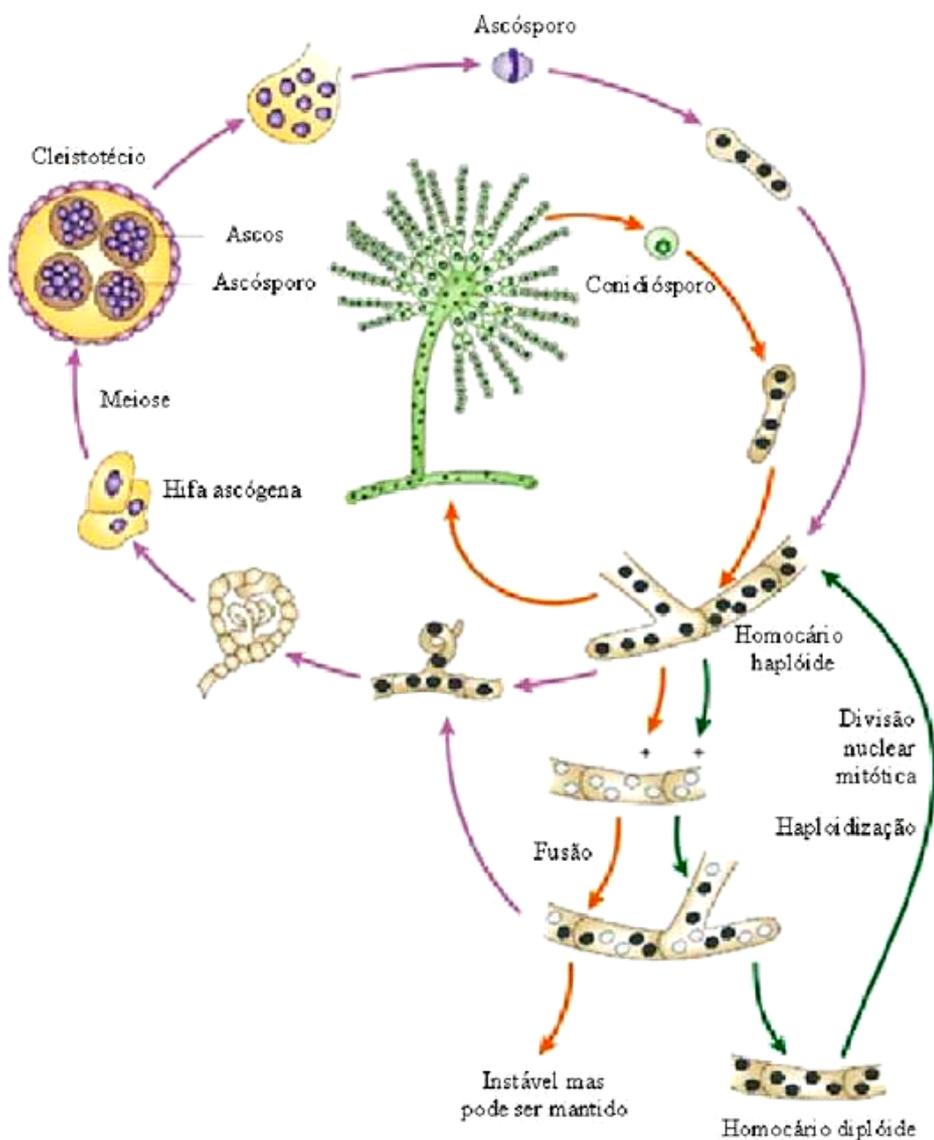


FIGURA 4: Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans* com as fases sexual (—), assexual (—) e parassexual (—). (Adaptado de CASSELTON & ZOLAN, 2002).

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral selecionar bons produtores de pectinase dentre os fungos presentes na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras-USP de Ribeirão Preto - SP. Em seguida objetivou-se caracterizar as enzimas brutas e caracterizar pelo menos uma enzima purificada.

Os objetivos específicos foram:

- Verificar as condições ótimas de crescimento e produção do complexo pectinolítico, cultivando o fungo em meios líquidos e sólidos;
- Estudar a influência de fontes de carbono na regulação do complexo pectinolítico;
- Caracterização bioquímica das enzimas brutas, quanto ao pH, temperatura, efeito de íons metálicos das atividades presentes em níveis enzimáticos satisfatórios;
- Aplicação de processos cromatográficos de purificação, visando à separação de múltiplos componentes e de proteínas contaminantes;
- Caracterização bioquímica de pelo menos uma poligalacturonase purificada, quanto ao pH, temperatura, efeito de íons metálicos, constantes cinéticas ( $K_m$ ,  $V_{max}$ , eficiência catalítica, focalização isoeletrica), das atividades presentes em níveis enzimáticos satisfatórios.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS

Utilizando os fungos: *Aspergillus niveus*, isolado de *Mangifera indica*; *A. caespitosus* isolado da *Solanum tuberosum*; *Rizopus microsporus* var. *rizopodiformis*, coletado a partir do solo em Pirassununga-SP; todos presentes na micoteca do laboratório e *Penicillium herquei*, do Laboratório de Bioquímica do Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas da UNIOESTE de Cascavel/PR, padronizou-se o uso de *A. niveus* para esse estudo.

#### 3.2 MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS EM LABORATÓRIO

A manutenção rotineira das cepas em laboratório foi realizada em tubos de ensaio estéreis contendo sílica gel. Para isso, os esporos foram solubilizados com leite Molico<sup>®</sup>, adsorvidos na sílica gel e mantidos congelados. Posteriormente, as cepas foram transferidas para tubos de ensaio estéreis contendo de 10 a 15 mL de meio de cultura inclinado, constituído por ágar bacteriológico 2% e farinha de aveia 4%. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica, em temperaturas entre 28-30°C e foram realizados repiques periódicos. Em seguida, as cepas foram conservadas em geladeira por um período de até 30 dias. Todos os passos foram conduzidos de forma asséptica.

#### 3.3 OBTENÇÃO DAS CULTURAS EM MEIO LÍQUIDO

Primeiramente, obteve-se uma solução adicionando água destilada estéril ao tubo de ensaio, solubilizando os esporos do fungo com o auxílio de bastão de vidro. Depois procedeu-se diluições necessárias para a contagem de esporos presentes

na solução na Câmara de Neubauer. Para inóculo usou-se uma solução com  $5,0 \cdot 10^4$  esporos por mL.

- **Seleção de Bons Produtores**

Durante a seleção do melhor fungo produtor de pectinases, as culturas líquidas foram obtidas mediante inóculo de 1,0 mL de uma solução de esporos em 25mL de meio de cultivo contidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Os meios foram suplementados com Pectina 1% (segundo POLIZELI *et al.*, 1996) e incubados a 28°C, sob agitação orbital a 100 rpm, por 48 horas.

- **Otimização**

Somente o fungo *A. niveus* foi considerado bom produtor de pectinases. O fungo foi então cultivado em meio Czapeck, suplementado com 1% de fonte de carbono, a 40°C por 48 horas ou por diferentes períodos, conforme determinado para cada experimento. Pectina 1% foi testada conforme CROTTI *et al.* (1996, 1998a e b). A indução do complexo pectinolítico por resíduos, como farelo de trigo, maçã triturada, laranja triturada ou outros com alta porcentagem de pectina na sua constituição, também foi investigada.

Os meios testados e suas composições estão descritos a seguir:

**Meio Adams (ADAMS, 1990)**

- Extrato de levedura.....0,2g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  .....0,1g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....0,05g
- Pectina cítrica Sigma.....1g
- Água destilada q.s.p .....100mL

**Meio Khanna (KHANNA *et al.*, 1995)**

- Solução de sais de Khanna [20x].....5,0mL
- Extrato de levedura.....0,1g
- Pectina cítrica Sigma.....1,0g
- Água destilada q.s.p.....100mL

**Solução de sais de Khanna [20X]**

- $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....2,0g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....1,3g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....0,362g
- KCl.....0,098g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....0,007g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....0,0138g
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....0,0066g
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....0,0062g
- Água destilada q.s.p.....100mL

**Meio Khouvine**

- Uréia.....0,25g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....0,1g
- NaCl.....0,1g
- Peptona.....0,1g
- Pectina cítrica Sigma.....1,0g
- Água destilada q.s.p.....100mL

**Meio Vogel (VOGEL, 1964)**

- Solução de sais de Vogel [50X].....2,0mL
- Solução de biotina.....20µL
- Pectina.....1,0g
- Água destilada q.s.p.....100mL

**Solução de sais de Vogel [50X]**

- Citrato de sódio pentahidratado.....15g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  .....25g
- $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....10g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....1,0g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....0,5g
- Solução de traços de elementos.....0,5mL
- Clorofórmio.....0,5mL
- Água destilada q.s.p.....100mL

**Solução de biotina**

- Biotina.....0,05g
- Etanol 50%.....100mL

Solução traços de elementos

- Ácido cítrico. H<sub>2</sub>O.....5g
- ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....5g
- Fe<sub>2</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O.....1g
- CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O.....0,25g
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.....0,05g
- MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.....0,05g
- Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O.....0,05g
- Clorofórmio.....1mL

**Meio Czapek (WISEMAM, 1975 )**

- NaNO<sub>3</sub>.....0,3g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,1g
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0,05g
- KCl.....0,05g
- Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0,001g
- Extrato de levedura.....0,1g
- Pectina cítrica Sigma.....1g
- Água destilada q.s.p.....100mL

**Meio Klausen (PERALTA *et al*, 1990)**

- CaCO<sub>3</sub>.....0,1g
- Peptona.....0,1g
- NaCl.....0,5g
- Gelatina.....0,25g
- Extrato de levedura.....0,1g
- Pectina cítrica Sigma.....1g
- Água destilada q.s.p.....100mL

**Meio SR (RIZZATTI *et al.*, 2001)**

- Solução de sais SR [20X]-.....5,0mL
- Peptona.....0,02g
- Extrato de levedura.....0,45g
- Pectina cítrica Sigma.....1g
- Água destilada q.s.p.....100mL

**Solução de sais SR [20X]**

- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....0,24g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0,3g
- NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....1,0g
- Água destilada q.s.p.....100mL

### 3.4 EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS INTRACELULARES E EXTRACELULARES DO MEIO LÍQUIDO

Culturas obtidas dos meios utilizados, como descritos anteriormente, foram filtradas a vácuo em funil de Büchner, obtendo-se um filtrado livre de células e um micélio. O filtrado foi dialisado e então, utilizado para a determinação das atividades pectinolíticas extracelulares. O micélio foi lavado em água destilada, prensado em papel de filtro para retirar o excesso de água e pesado para determinação da massa úmida. Para a obtenção do extrato bruto, o micélio foi macerado com 2 volumes de areia previamente tratada com solução sulfocrômica, em gral de porcelana, mantido em gelo. O macerado foi ressuspensado em 10 mL de solução tampão e o material foi então centrifugado a 13000g, durante 15 minutos, a 4°C, para remoção da areia e dos restos celulares. O sobrenadante obtido, chamado de extrato bruto micelial, foi utilizado para a determinação da atividade pectinolítica intracelular.

### 3.5 OBTENÇÃO DAS CULTURAS EM MEIO SÓLIDO E EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS EXTRACELULARES

As culturas foram obtidas mediante inóculo de 1,0 mL de uma solução com esporos, ressuspensos em água destilada, nos meios de cultivo em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo a seguinte composição de meio:

**Meio substrato sólido:**

- Fonte de carbono .....4g
- Água destilada q.s.p.....2mL

Os meios foram suplementados com diferentes fontes de carbono e incubados em estufa bacteriológica a 40°C por 5 dias.

As culturas obtidas dos meios utilizados foram ressuspensas em 50mL de água destilada e agitadas em agitador magnético por 30 minutos, a 4°C. Posteriormente, foram filtradas a vácuo em funil de Büchner, obtendo-se um filtrado livre de células. O filtrado foi dialisado e então, utilizado para a determinação das atividades pectinolíticas extracelulares.

### **3.6 DOSAGENS ENZIMÁTICAS**

#### **3.6.1 DOSAGEM DA ATIVIDADE POLIGALACTURONASE PELO MÉTODO D.N.S.**

A determinação da atividade de poligalacturonase (endo e exo) foi através da reação com ácido 3', 5' dinitrosalicílico (DNS), descrito por MILLER (1959), onde 250µL de amostra enzimática foi incubada com 250 µL da solução de polipectato de sódio 1% dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mM, inicialmente em pH 6,0, sendo padronizado, posteriormente, no pH ótimo da enzima. A temperatura do ensaio inicial foi 40°C, posteriormente padronizado na temperatura ótima da enzima. Desta mistura de reação foram retiradas alíquotas de 100 µL, com 10 minutos, e adicionadas em tubos contendo 100 µL de DNS. Após a coleta do ponto experimental, os tubos de ensaio foram fervidos por 5 minutos e após seu resfriamento em água corrente, foi adicionado 1,0 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi em espectrofotômetro a 540 nm contra um branco que representa o tempo zero da reação, no qual a hidrólise espontânea do substrato é mínima.

Uma unidade de atividade poligalacturonásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de açúcar redutor, por minuto, nas

condições de ensaio, utilizando uma reta padrão obtida a partir do ácido monogalacturônico e a atividade específica como sendo U total/mg de proteína total.

### 3.6.2 DOSAGEM DA PECTINA LIASE

A atividade da pectina liase foi determinada segundo método de AYERS *et al.* (1966), descrito por PITT (1988), onde foi medida a reação entre os produtos insaturados finais da degradação da pectina e o ácido tiobarbitúrico. A mistura de reação consistiu em 5,0 mL da solução de pectina 1,0% em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5; 1,0 mL da solução de  $\text{CaCl}_2$  0,01 M; 1,0 mL da solução enzimática e 3,0 mL de água destilada. Após a incubação por 2 horas a 30°C, foi adicionado 0,6 mL de uma solução de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  9% em seguida 0,6 mL de NaOH 0,5 M. As proteínas precipitadas do substrato não consumido foram removidas por centrifugação a 3000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi adicionado à mistura de 3,0 mL do ácido tiobarbitúrico 0,04 M; 1,5 mL de HCl 0,1 M e 0,5 mL de água destilada. A mistura foi fervida em banho-maria por 30 minutos, esfriada e a absorbância lida à 550 nm contra um branco, que continha os mesmos reagentes da mistura de reação, acrescentados de  $\text{ZnSO}_4$  e NaOH imediatamente após a adição da enzima. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que causa a mudança de 0,1 na absorbância à 550 nm, nas condições do ensaio.

### 3.7 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Para verificar a cinética de reação da poligalacturonase, incubou-se a enzima e o substrato na temperatura ótima de reação em diferentes tempos: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 minutos, seguido da dosagem de açúcar redutor no ensaio.

### **3.8 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS E OUTROS MÉTODOS ANALÍTICOS**

A quantificação de proteínas foi realizada segundo a metodologia descrita por LOWRY *et al.* (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. A unidade protéica foi definida como mg de proteína/mL.

### **3.9 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

A temperatura ótima de atividade da poligalacturonase procedeu-se através da dosagem de açúcares redutores pelo método do D.N.S em diferentes temperaturas, que variaram de 30 a 80°C.

A temperatura ótima de atividade de pectina liase foi determinada segundo método de AYERS *et al.* (1966), descrito por PITT (1988) em temperaturas de 30 a 70°C.

### **3.10 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ESTABILIDADE DAS ENZIMAS PECTÍNOLÍTICAS**

Os filtrados obtidos dos cultivos dos fungos foram incubados em diferentes temperaturas, 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C, retirados em 30 minutos e colocados em banho de gelo. Em seguida verificou-se a atividade enzimática através de dosagem de açúcares redutores pelo método D.N.S. e pelo método de AYERS *et al.* (1966) (conforme descrito anteriormente). Com a poligalacturonase purificada utilizou-se temperaturas de 50°C, 55°C, 60°C e 65°C.

O estudo da termoestabilidade das atividades pectinolíticas foi determinado a 60°C, 65°C e 70°C, quando incubadas por no máximo 90 minutos, nas diferentes temperaturas, seguida da avaliação da atividade enzimática residual pelo método D.N.S. e de AYERS *et al.* (1966).

### 3.11 EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE PECTINOLÍTICA

A influência do pH na atividade enzimática foi verificada, solubilizando o substrato da reação (polipectato de sódio), em tampão citrato-fosfato 100 mM (tampão McIlvaine), variando o pH entre 3,0 e 8,0. Posteriormente verificou-se a atividade enzimática através de dosagem de açúcares redutores pelo método D.N.S.

### 3.12 EFEITO DO pH SOBRE A ESTABILIDADE DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

O efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas foi investigado pela adição de tampão citrato-fosfato 100 mM (tampão McIlvaine), ajustado em cada valor de pH estudado. A mistura enzima – tampão permaneceu à temperatura de 4°C por 24 horas e, em seguida, uma alíquota de 250 µL foi retirada e incubada com a mistura reacional descrita na metodologia do método D.N.S., utilizando-se o dobro da concentração do tampão, nesta reação.

### 3.13 DETERMINAÇÃO DO EFEITO DE ÍONS SOBRE A ATIVIDADE DA POLIGALACTURONASE

O efeito de vários íons sobre a atividade da poligalacturonase foi determinado pela incubação do substrato em solução de diferentes íons, como  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Al}^-$ , além de EDTA, todos nas concentrações finais de 1 e 10mM, para a enzima bruta, e  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Br}^{++}$ ,  $\text{Pb}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{F}^-$  e EDTA nas concentrações finais 0,5, 1 e 10 mM, para a enzima purificada, seguido pelo ensaio enzimático.

### **3.14 PURIFICAÇÃO DAS POLIGALACTURONASES EXTRACELULARES**

O extrato bruto obtido de culturas submersas foi primeiramente dialisado contra água destilada por aproximadamente 24 horas. Em seguida, a amostra foi aplicada em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE celulose (10 x 2cm), previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 10mM pH7,5. O fluxo foi estabelecido de 2,0mL por minuto. A enzima foi eluída com 200mL de gradiente de NaCl de 0 a 1M. Foram coletados frações de 10mL para leitura a 280nm e dosagem enzimática, sendo que aquelas que continham maior atividade poligalacturonásica foram reunidas e posteriormente dialisadas.

Posteriormente, a amostra foi liofilizada e ressuspensa em 1mL de tampão acetato de sódio 100mM pH6,0, para ser aplicada em coluna de gel filtração Biogel P100 (110 x 2cm) equilibrada com o mesmo tampão. O fluxo foi estabelecido em 0,05mL por minuto. Foram coletadas frações de 1,0mL para leitura a 280nm e dosagem enzimática, sendo que aquelas que continham maior atividade poligalacturonásica foram reunidas em dois "pools".

### **3.15 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA EM GEL DE ELETROFORESE EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)**

As eletroforeses em condições desnaturantes foram realizadas em gel de poliacrilamida conforme metodologia descrita por LAEMMLI (1970). Os géis utilizados tinham a concentração de 12% de acrilamida e foram polimerizados em placas de vidro (7,2 x 10,2cm). As amostras foram preparadas na proporção de 1:1 em tampão de amostra (glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,002% e Tris 0,12M, pH 6,75) e aquecidas durante 3 minutos em água fervente. As eletroforeses foram realizadas em tampão composto por Tris 0,025M, glicina 0,19M e SDS 0,1%,

pH 8,3, durante 1-2 horas sob corrente de 70mA e 120V. Foram utilizados marcadores moleculares de 10 a 220kDa BenchMark™ Protein Ladder da GibcoBRL.

As revelações dos géis foram feitas com nitrato de prata, e seguiram as etapas descritas abaixo (BLUM *et al.*, 1987):

- Duas incubações de 20 minutos de etanol 50% (v/v);
- Incubação de 20 minutos em etanol 30% (v/v);
- Incubação de 1 minuto em solução de pré-tratamento;
- 3 lavagens com água destilada (20 segundos cada lavagem);
- Incubação de 20 minutos em solução de impregnação;
- 3 lavagens com água destilada (20 segundos cada lavagem);
- Incubação em solução de revelação;
- Lavagem com água destilada;
- Incubação de 10 minutos em solução de inibição da revelação;
- Manutenção em metanol 50% (v/v) por, no mínimo, 20 minutos;

Em seguida, o gel foi prensado em papel celofane umedecido com solução dessecante composta por glicerol 1% (v/v) e metanol 40% (v/v).

- Solução de pré-tratamento

tiosulfato de sódio..... 0,02g

água destilada q.s.p..... 100mL

- Solução de impregnação

nitrato de prata ..... 0,2g

formol 37% ..... 75µL

água destilada q.s.p. .... 100mL

- Solução de revelação

carbonato de sódio .....	6,0g
tiosulfato de sódio .....	0,02g
formol 37% .....	50µL
água destilada q.s.p. ....	100mL

- Solução inibitória da revelação

metanol .....	50mL
ácido acético .....	12mL
água destilada q.s.p. ....	100mL

### 3.16 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA PGPI

Foram realizados dois experimentos para determinação da massa molecular SDS-PAGE e FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Primeiramente, a amostra foi aplicada em SDS-PAGE juntamente com padrões moleculares de 10 a 220kDa, descrito anteriormente. Com posse dos dados obtidos nos resultados pôde-se traçar uma reta padrão para projetar o valor de Rf da amostra, a fim de calcular sua massa molecular a partir do logaritmo obtido.

Em seguida, a 20µl da PGPI foram aplicados em uma coluna Bio-Sil-Sec-400, com 0,7x30cm, em FPLC BioRad model 2800-Solvent Delivery System, eluído em tampão fosfato de sódio 10mM, NaCl 15mM e azida 10mM, pH 6,8, utilizando gamaglobulina bovina (158kDa), ovoalbumina (44kDa) e mioglobulina (17kDa) como padrões.

### 3.17 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE

Para análise dos produtos de hidrólise, quantidades equivalentes de enzima e solução de polipectato de sódio SIGMA 1% em tampão acetato de sódio, pH 4,0 (pH ótimo de reação), foram incubados em banho-maria a 55°C. Alíquotas foram retiradas em tempos variados e fervidas, a fim de parar a reação. Foram aplicados 10µL de cada alíquota em cromatografia de sílica em camada delgada, utilizando ácidos mono, di e trigalacturônicos 10mM como padrões. As placas foram reveladas com orcinol 0,2% em n-butanol, água e ácido acético 5:3:2 em estufa bacteriológica à 100°C.

### 3.18 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO

O ponto isoelétrico (pI) da poligalacturonase purificada foi determinado em gel de poliacrilamida (5%), polimerizado em tubo (0,5 x 15 cm), de acordo com a metodologia descrita por O'FARREL *et al.* (1977) usando anfólito da Pharmalite® com uma faixa de pH entre 3,0 e 7,5. Dois géis foram corridos, um gel controle que não continha a amostra enzimática e um gel com a amostra de poligalacturonase.

Após uma eletroforese de 6 horas a 500V, em temperatura ambiente, os géis foram cortados em fragmentos de 0,5cm. Os fragmentos do gel controle foram adicionados a 1mL de solução de KCl 25mM por uma noite. Decorrido esse período, as fatias do gel controle, tiveram seu pHs mensurados para determinar o gradiente de pH. O gel com a amostra enzimática foi submetido à coloração por Coomassie Blue. A determinação do pI da poligalacturonase purificada procedeu-se mensurando qual fatia do gel controle era equivalente à distancia da banda, em relação à origem, obtida no gel.

### 3.19 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS

O conteúdo de carboidratos das pectinases extracelulares purificadas foram estimados através da metodologia de fenol-sulfúrico descrito por DUBOIS *et al.* (1956). Nesse experimento, adicionou-se 1mL de ácido sulfúrico concentrado em uma mistura composta por 0,2mL de enzima, 0,2mL de água destilada e 0,01mL de fenol 80% (v/v). Essa mistura foi agitada e colocada em gelo por 10 minutos. Posteriormente, essa foi incubada a 30°C. Percorridos 15 minutos, a mistura foi novamente agitada e procedeu-se a leitura a 490nm. Foi realizado um branco, onde no lugar da enzima foi adicionado água destilada. Para determinação da porcentagem de carboidratos utilizou-se uma curva de manose (0-0,4mg/mL) como padrão.

### 3.20 ESTUDO CINÉTICO DA POLIGALACTURONASE PURIFICADA

As constantes cinéticas ( $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ ) das poligalacturonases foram determinadas conforme os procedimentos gráficos propostos por MICHAELIS-MENTEN (1913) e HANES utilizando-se o programa Enzyplot (LEONE *et al.* 1995). O substrato utilizado foi polipectato de sódio Sigma, com 85% de pureza, nas concentrações de 0,5-25mg/mL. A atividade poligalacturonásica foi determinada nas condições ótimas da enzima.

### 3.21 SEQUENCIAMENTO DA PGPI

O seqüenciamento N-terminal da poligalacturonase purificada PGPI foi realizado em colaboração com a Prof. Dra I. Y. Hirata do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo, em um seqüenciador PPSQ/23 da Shimadzu

Corporation (Tokyo-Japan), com sistema de HPLC isocrático, utilizando a metodologia da Degradação de Edman.

As informações obtidas por este método serviram como base para a comparação com outras proteínas. Esse processo é feito confrontando a seqüência de aminoácidos com informações contidas em bancos de dados, através da utilização de programas encontrados em sites especializados, tal como o BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

### **3.22 EFEITO DE SOLVENTES ORGÂNICOS NA ATIVIDADE DA PGPI**

O efeito de solventes orgânicos sobre a atividade da poligalacturonase PGPI foi determinado pela incubação da enzima com 20% de solvente, e posterior ensaio enzimático. Os solventes utilizados foram metanol, etanol, isopropanol, butanol, acetona, benzeno, tolueno, n-hexano, formaldeído, éter etílico e dimetil-sulfóxido (DMSO).

### **3.23 REPETIBILIDADE DOS ENSAIOS**

Todos os experimentos foram realizados em triplicata a fim de gerar confiabilidade nos resultados.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS PECTINOLÍTICOS

Para escolher qual seria o fungo para esse estudo, ponderaram-se os valores de atividade enzimática, atividade específica e peso úmido do micélio. Como se pode verificar na Tabela 1, embora o fungo *P. herquei* tenha apresentado o maior valor de atividade específica (0,67U/mg de proteína), os valores de atividade enzimática foram baixos, juntamente com seu crescimento, mostrado pelo baixo peso úmido do micélio. Por esse motivo, *A. niveus* foi o fungo escolhido para dar continuidade ao trabalho, apresentando o segundo maior valor de atividade enzimática específica, um bom crescimento e os maiores níveis de atividade enzimática (U/mL).

O *A. niveus*, indiscutivelmente, foi o melhor produtor, onde observou-se níveis enzimáticos intracelulares altos com os meios Adams, SR e Czapeck. Entretanto, como para os propósitos biotecnológicos e de purificação enzimática, os níveis extracelulares são mais importantes, optou-se pela continuação dos estudos com os meios Adams e Czapeck. Com relação ao crescimento, a composição do meio Khanna foi a que proporcionou maior crescimento entre os diferentes fungos, entretanto devido à baixa atividade pectinolítica, a atividade específica não foi representativa com este meio. Assim, descartou-se a sua utilização para os próximos experimentos. Em adição, os meios de crescimento de Adams e Czapeck apresentaram valores altos e muito próximos de peso úmido, 0,6g e 0,7g, respectivamente, para *A. niveus*. O experimento descrito a seguir foi realizado ainda com os dois meios, com o objetivo de analisar a produção pectinolítica, nestas composições, em função do tempo.

TABELA 1: Crescimento e atividade poligalacturonásica intra e extracelulares usando diferentes meios.

Fungos	Meio de Crescimento	Atividade Enzimática (U/mL)		Atividade Enzimática (%)		Peso Úmido (g)	Proteína (mg/mL)		Atividade Específica (U/proteína)
		intra	extra	Intra	extra		micelio	intra	
<i>A. niveus</i>	M5	0,01	0,03	14	86	0,3	0,2	1,2	0,03
	<b>Adams</b>	0,24	0,06	81	19	<b>0,6</b>	0,7	0,3	<b>0,30</b>
	Khanna	0,09	0,02	85	15	1,1	0,1	0,4	0,23
	Khouvine	0,03	0,00	100	0	0,1	0,3	1,1	0,02
	Vogel	0,10	0,03	77	23	0,3	0,1	0,4	0,30
	SR	0,18	0,03	85	15	0,7	0,2	0,4	0,36
	<b>Czapeck</b>	0,11	0,09	54	46	<b>0,7</b>	0,3	0,2	<b>0,48</b>
<i>A. caespitosus</i>	M5	0,03	0,03	53	47	0,8	0,7	1,1	0,03
	Adams	0,04	0,01	87	13	0,1	0,7	0,3	0,04
	Khanna	0,04	0,02	69	31	1,3	0,7	0,4	0,05
	Khouvine	0,02	0,04	37	63	0,4	0,4	0,4	0,09
	Vogel	0,04	0,00	100	0	0,1	0,5	0,2	0,05
	SR	0,05	0,05	50	50	0,6	0,6	0,2	0,12
	Czapeck	0,07	0,00	98	2	0,9	0,5	0,1	0,14
<i>R. microsporus</i>	M5	0,04	0,01	80	20	0,5	0,0	0,4	0,13
	Adams	0,03	0,05	42	58	0,5	0,7	0,3	0,08
	Khanna	0,04	0,00	100	0	0,7	0,5	0,5	0,04
	Khouvine	0,04	0,04	48	52	0,3	0,0	0,2	0,35
	Vogel	0,03	0,00	100	0	0,2	0,5	0,2	0,05
	SR	0,00	0,02	4	96	0,4	1,0	0,3	0,01
	Czapeck	0,06	0,02	73	27	0,2	0,3	0,1	0,19
<i>P. herquei</i>	M5	0,06	0,01	82	18	0,2	1,0	1,1	0,04
	Adams	0,06	0,04	60	40	0,3	0,1	0,2	0,31
	Khanna	0,02	0,03	38	62	0,3	1,0	0,4	0,04
	Khouvine	0,02	0,00	100	0	0,1	0,2	0,4	0,03
	Vogel	0,02	0,05	34	66	0,1	0,0	0,1	0,67
	SR	0,01	0,01	47	53	0,1	0,8	0,3	0,01

Cultivo: Meios suplementados com pectina cítrica 1% por 48 horas, sob agitação, a 28°C.

## 4.2 CRESCIMENTO E PRODUÇÃO PECTINOLÍCA DO *A. niveus* EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CULTIVO

Neste experimento verificou-se o crescimento do *A. niveus* em função do tempo, o qual foi estimado pela formação de estruturas miceliais expressas pela quantidade de proteína sintetizada, e também teve o intuito de verificar em qual dia o fungo produziria maiores quantidades de poligalacturonases. O fungo foi incubado a 40°C sob duas condições diferentes, agitação orbital a 100rpm e estacionário, em dois meios distintos, Adams e Czapeck, e foi verificado o desenvolvimento do fungo a cada 24 horas.

Neste sentido, a Figura 5 ilustra que a produção máxima de poligalacturonase ocorreu no 9º dia de crescimento, em condições estacionárias, utilizando-se o meio Adams (142,5 U totais), com valores próximos aos obtidos para o meio Czapeck, com 5 dias de crescimento (138,5 U totais). No entanto, optou-se por cultivar o fungo no meio Czapeck, sob agitação por 2 dias, nos demais experimentos relatados. Dessa forma pode-se economizar tempo de cultivo, agilizando os experimentos, tendo ainda uma produção enzimática considerável (101,6 U totais). Deste experimento, dosou-se a pectina liase produzida no meio Czapeck, em cultivos sob agitação, porém os níveis enzimáticos foram muito baixos, como ilustrado na Figura 6.

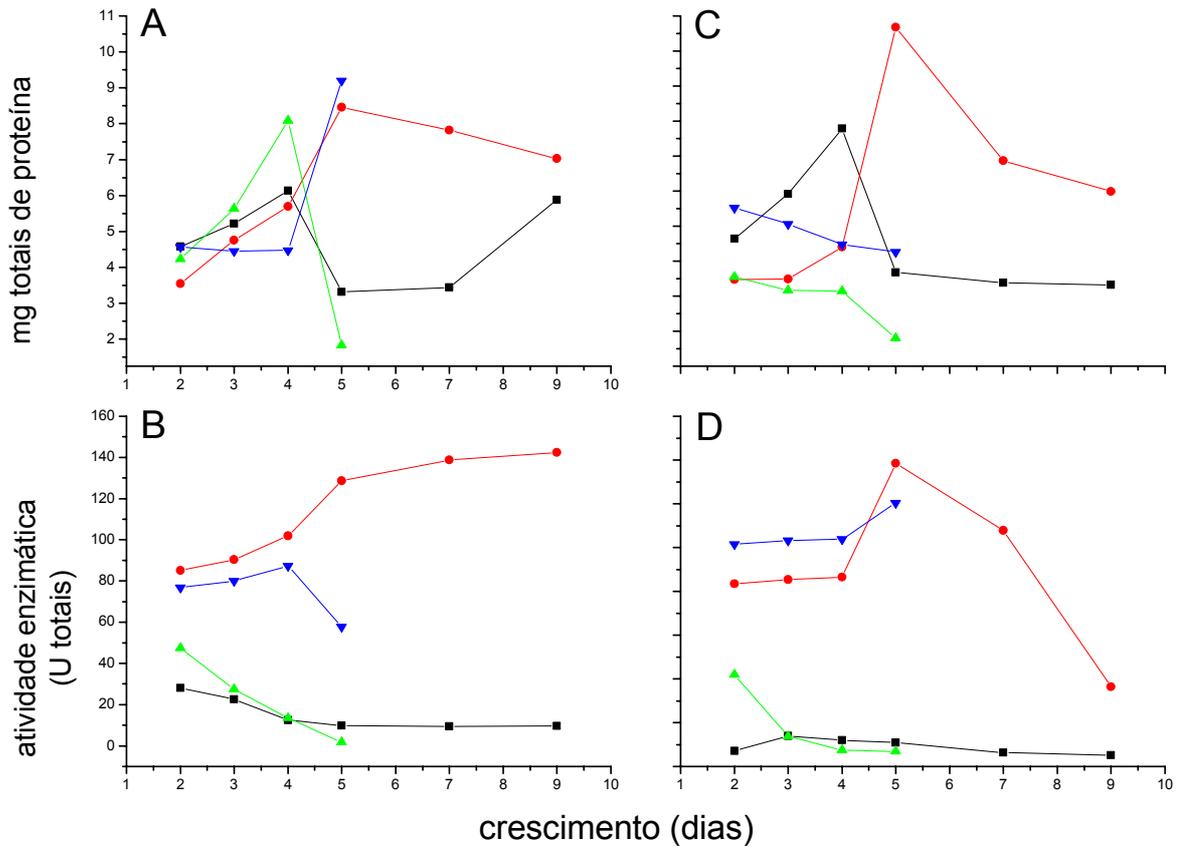


FIGURA 5: Crescimento e atividade de poligalacturonase produzida por *A. niveus* em função do tempo. Meios: (A) e (B) Adams; (C) e (D) Czapeck; Dosagens: (■) intracelular em crescimento estacionário; (●) extracelular em crescimento estacionário; (▲) intracelular em crescimento com agitação e (▼) extracelular em crescimento com agitação.

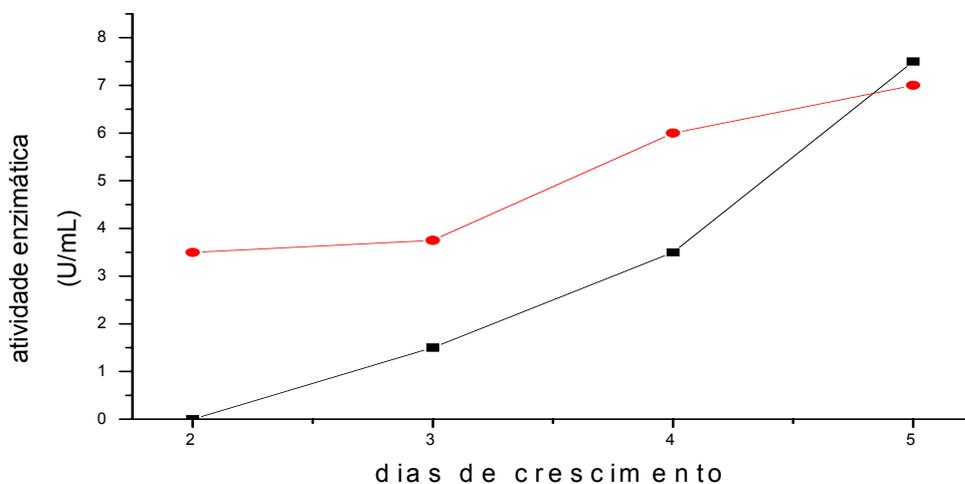


FIGURA 6: Determinação de pectina liase produzida por *A. niveus* em função do tempo. Meio Czapeck, sob agitação. (●) enzima intracelular; (■) enzima extracelular.

### 4.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO SOBRE A PRODUÇÃO DE PECTINASES E PARA CRESCIMENTO DE *A. niveus*

A concentração de esporos, numa solução para inoculo, mostra-se muito importante, uma vez que uma maior quantidade de esporos viáveis inoculados, poderia levar a um aumento na massa micelial. Para comprovar essa hipótese e verificar se há uma quantidade ideal de esporos para o inóculo e visando otimizar o crescimento do fungo, analisou-se a melhor concentração da solução de esporos para o *Aspergillus niveus* em meio líquido Czapeck. A Figura 7 ilustra que, nestas condições experimentais, não atingiu-se um limite máximo de esporos no inóculo, uma vez que não houve declínio no índice de crescimento e nem no nível de atividade enzimática, com o aumento da concentração de esporos usada. No entanto, não se pôde utilizar uma concentração superior à  $5 \times 10^6$  esporos por mL, uma vez que esse foi o número máximo de esporos obtidos a partir da linhagem estoque. Em adição, neste experimento observa-se uma clara relação entre a quantidade de esporos inoculados e o aumento da atividade enzimática, ou seja, quanto maior o inoculo, maior a produção enzimática.

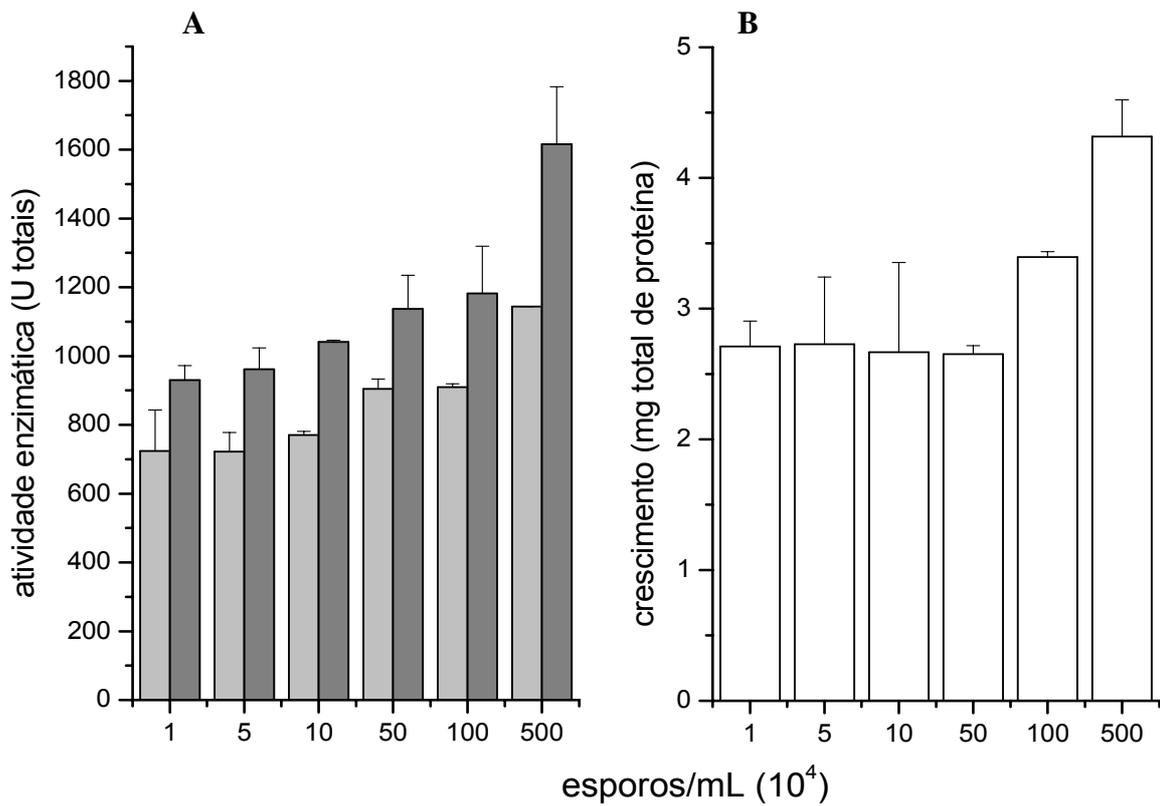


FIGURA 7: Efeito da concentração de inóculo sobre a produção de pectinases e crescimento de *A. niveus*. Fungo cultivado em meio Czapeck suplementado com pectina 1%, por 72 horas a 40°C, com agitação. (A) Poligalacturonase (—) e Pectina Liase (—); (B) Proteína.

#### 4.4 EFEITO DE FONTES DE CARBONO

O efeito de indutores e repressores na síntese de pectinases foi analisado suplementando os meios de cultivo Czapeck com 29 fontes de carbono, cujos resultados de produção estão ilustrados na Tabela 2. Nesta tabela, o crescimento do fungo está expresso pela quantidade de proteínas intracelulares totais. Os cultivos foram realizados sob agitação orbital, por 2 dias.

As fontes que mais se destacaram como indutores da atividade pectinolítica foram a casca de laranja-pêra (*Citrus sinensis*) (335 U totais), pectina SIGMA<sup>®</sup> (319 U totais), pectina 8003 CPKelco (315 U totais), casca de maracujá (*Passiflora edulis*) (313 U totais) e pectina VETEC<sup>®</sup> (307 U totais) para a atividade da poligalacturonase, determinada pela formação de açúcares redutores.

Para a atividade da pectina liase, a média dos valores obtidos foi baixa, porém se destacaram como fonte de carbono, a casca de maçã (*Malus domestica*) (1825 U totais), de laranja-pêra (1275 U totais), de maracujá (1075 U totais), a pectina 7128 CPKelco (425 U totais) e a pectina SIGMA (350 U totais), como ilustrado na Tabela 3.

Tabela 2: Crescimento de *A. niveus* e produção de poligalacturonases em meio Czapeck suplementado com fontes de carbono variadas.

Fonte de carbono (1%)	Crescimento (mg total de proteína)	Atividade (U totais)
Pectina SIGMA <sup>®</sup>	1.9	319
Sem fonte	0.1	36
Glicose	0.1	16
Ácido monogalacturônico	0.1	102
Polipectato de sódio	0.2	124
Pectina 7128	2.5	286
Pectina USP-B	2.5	274
Pectina JMH6	2.5	236
Pectina GENU <sup>®</sup> 8001*	2.2	268
Pectina GENU <sup>®</sup> 8003*	2.6	315
Sacarose	3.8	197
Pectina VETEC <sup>®</sup>	1.7	307
Galactose	3.1	26
Trealose	2.6	67
Rafinose	2.7	60
Arabinose	3.8	172
Amido Penetrose	5.2	170
Goma guar	3.7	244
Casca de maçã ( <i>Malus domestica</i> )	4.5	248
Casca de laranja-pêra ( <i>Citrus sinensis</i> )	2.4	335
Casca de limão-tahiti ( <i>Citrus latifolia</i> )	3.1	300
Casca de maracujá ( <i>Passiflora edulis</i> )	3.6	313
Erva de chimarão ( <i>Illex paraguarienses</i> )	4.9	136
Erva de tererê ( <i>Illex paraguarienses</i> )	3.2	122
Palha de arroz ( <i>Oryza sativa</i> )	1.0	35
Bagaço de cana ( <i>Saccharum officinarum</i> )	1.6	95
Sabugo de milho ( <i>Zea mays</i> )	1.2	105
Farelo de tigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	3.1	92
Farelo de soja ( <i>Glycine max</i> )	3.3	73

\*8001/8003: Obtidas a partir da CPKelco Brasil S/A.

Cultivo: Meio Czapeck suplementado com 1% de fonte de carbono por 48 horas, sob agitação orbital, a 40°C.

Tabela 3: Crescimento de *A. niveus* e produção de pectina liase em meio Czapeck suplementado com fontes de carbono variadas.

Fonte de carbono (1%)	Crescimento (mg total de proteína)	Atividade (U totais)
Glicose	0.1	150
Ácido monogalacturônico	0.1	175
Polipectato de sódio	0.2	225
Pectina SIGMA®	1.9	350
Pectina 7128	2.5	425
Pectina USP-B	2.5	350
Pectina JMH6	2.5	150
Pectina GENU® 8001*	2.2	325
Pectina GENU® 8003*	2.6	175
Casca de maçã ( <i>Malus domestica</i> )	4.5	1825
Casca de laranja-pêra ( <i>Citrus sinensis</i> )	2.4	1275
Casca de limão-tahiti ( <i>Citrus latifolia</i> )	3.1	450
Casca de maracujá ( <i>Passiflora edulis</i> )	3.6	1075
Erva de tererê ( <i>Illex paraguarienses</i> )	3.2	125
Bagaço de cana ( <i>Saccharum officinarum</i> )	1.6	150
Sabugo de milho ( <i>Zea mays</i> )	1.2	100

\*8001/8003: Obtidas a partir da CPKelco Brasil S/A.

Cultivo: Meio Czapeck suplementado com 1% de fonte de carbono por 48 horas, sob agitação orbital, a 40°C.

#### 4.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA FONTE DE CARBONO PARA A PRODUÇÃO DE PECTINASES E PARA O CRESCIMENTO DO *Aspergillus niveus*

A fonte de carbono do meio de cultivo possui fundamental importância para o crescimento do microrganismo, uma vez que apresenta-se como precursor de cadeias carbônicas para a síntese de todas as estruturas celulares. No entanto, algumas fontes em altas concentrações podem inibir a síntese de alguns compostos, como enzimas, por exemplo. A fim de otimizar a produção enzimática e o crescimento do fungo *Aspergillus niveus*, inoculou-se o microrganismo em meio Czapeck suplementado com diferentes concentrações de pectina Sigma® como fonte de carbono.

A Figura 8A mostra que a melhor concentração de pectina Sigma®, para a produção de poligalacturonase, foi de 2,0%, assim como para a produção de pectina liase. No entanto, para o crescimento, a melhor concentração foi de 3,5%, como ilustrado pela Figura 8B.

Estes resultados mostram que existe uma correspondência entre a quantidade de fonte de carbono e a formação de estruturas celulares, ou seja, crescimento. No entanto, observa-se uma inibição da produção da poligalacturonase e pectina liase pelo substrato, quando este apresenta-se em concentrações iguais ou superiores a 2,25%.

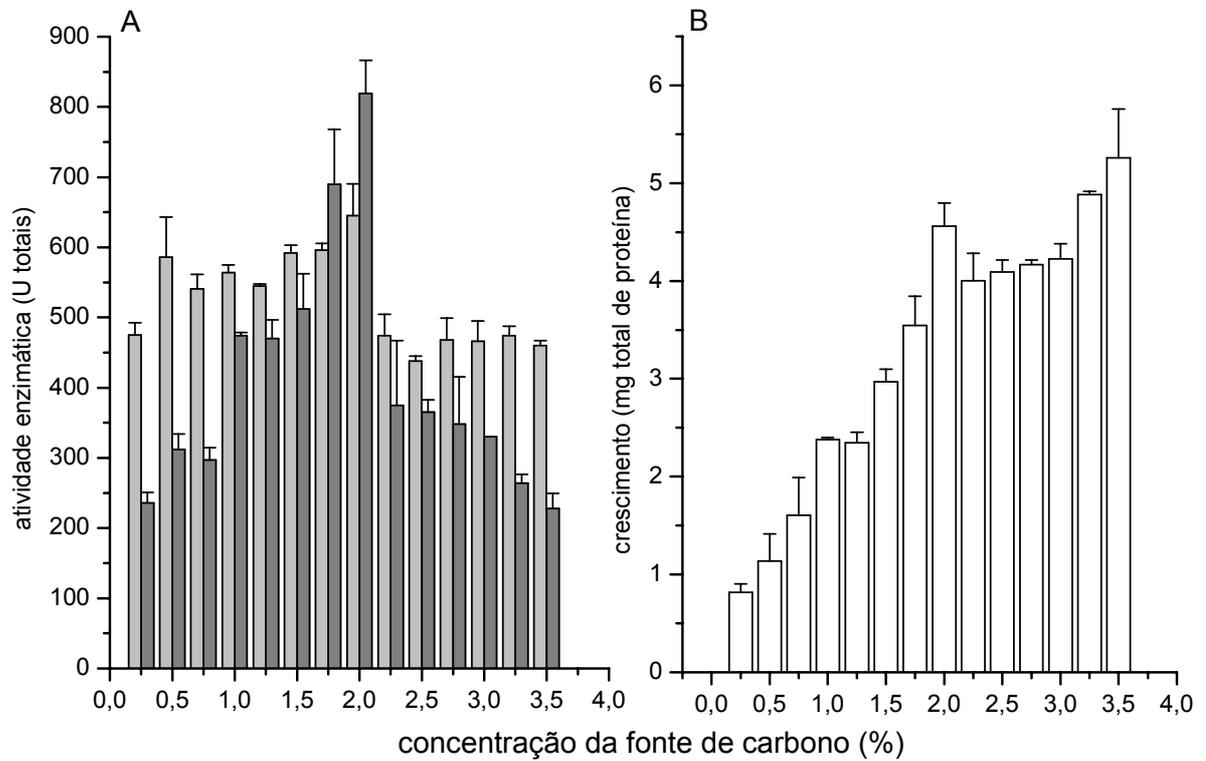


FIGURA 8: Efeito da concentração da fonte de carbono para a produção de pectinases e para o crescimento do *Aspergillus niveus*. (A) poligalacturonase (—) e pectina liase (—); (B) proteína micelial.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *A.niveus* EM MEIO SUBSTRATO SÓLIDO

Muitos fungos possuem uma alta produção de polissacaridases em meio substrato sólido, uma vez que o microrganismo encontra-se em contato direto com a fonte de carbono. Em virtude disso, verificou-se a produção de pectinases pelo *A. niveus* em meio substrato sólido utilizando-se várias fontes de carbono diferentes. A Tabela 4 ilustra a elevada produção de poligalacturonases cultivando o fungo com casca de limão tahiti (1324 unidades totais) e com pectina Vetec<sup>®</sup> (1276 unidades totais). No entanto, o *A.niveus* apresentou melhor crescimento com pectina 8003, sendo esta uma pectina amidada.

Além disso, comparou-se a produção de poligalacturonases em meio substrato sólido e em meio líquido de Czapeck, incubados sob as mesmas condições de crescimento. Como ilustrado na Tabela 5, pode-se observar que o fungo produziu mais enzima em todas as fontes (pectina Sigma<sup>®</sup>, pectina Vetec<sup>®</sup>, pectina 8003 CPKelco, casca laranja-pêra, casca de limão tahiti, casca de maracujá e casca de maçã) testadas em meio sólido, no entanto, o cultivo do microrganismo em meio sólido na escala laboratorial tornou-se inviável, uma vez que os posteriores processos de purificação seriam altamente prejudicados em virtude da grande presença de contaminantes no extrato bruto e da heterogeneidade de amostras, que seriam usadas como molécula indutora. Portanto, padronizou-se cultivar o microrganismo em meio líquido suplementado com 1% de pectina Sigma<sup>®</sup>.

Tabela 4: Avaliação de diferentes fontes de carbono sobre a produção de pectinases por *A. niveus* em meio substrato sólido.

Fonte	Poligalacturonase (U totais)	Pectina liase (U totais)	Crescimento (mg totais)
Pectina Sigma®	1020 ±49	90 ±0	30 ±0,9
Pectina Vetec®	1276 ±58	66 ±14	38 ±0,8
Pectina 8003*	840 ±43	38 ±15	60 ±3,8
Casca de laranja-pêra ( <i>Citrus sinensis</i> )	495 ±33	38 ±13	46 ±2,9
Casca de limão-tahiti ( <i>Citrus latifolia</i> )	1324 ±57	29 ±4	39 ±1,5
Casca de maracujá ( <i>Passiflora edulis</i> )	960 ±15	63 ±8	42 ±7,3
Casca de maçã ( <i>Malus domestica</i> )	311 ±36	90 ±3	42 ±2,4
Palha de arroz ( <i>Oryza Sativa</i> )	318 ±27	52 ±22	5 ±0,0
Farelo de trigo ( <i>Triticum aestivum</i> )	407 ±25	111 ±27	26 ±1,4
Sabugo de milho ( <i>Zea mays</i> )	416 ±1	49 ±11	14 ±0,5
Bagaço de cana ( <i>Saccharum officinarum</i> )	272 ±10	55 ±9	5 ±0,1

\*8003: Obtida a partir da CPKelco Brasil S/A

Cultivo: Meio substrato sólido composto por 2g de fonte de carbono acrescido de 4mL de água destilada, por 168 horas a 40°C.

Tabela 5: Comparação na produção de poligalacturonases por *A. niveus* cultivado em meio substrato sólido e em meio líquido de Czapeck, suplementados com diferentes fontes de carbono.

Fonte	Sólido (U totais)	Líquido (U totais)
Pectina Sigma <sup>®</sup>	1020 ±49	319 ±12
Pectina Vetec <sup>®</sup>	1276 ±58	307 ±15
Pectina 8003*	840 ±43	315 ±11
Casca de laranja-pêra ( <i>Citrus sinensis</i> )	495 ±33	335 ±19
Casca de limão-tahiti ( <i>Citrus latifolia</i> )	1324 ±57	300 ±21
Casca de maracujá ( <i>Passiflora edulis</i> )	960 ±15	313 ±26
Casca de maçã ( <i>Malus domestica</i> )	311 ±36	248 ±24

\*8003: Obtida a partir da CPKelco Brasil S/A

Cultivo: Meio Czapeck suplementado com 1% de fonte de carbono por 48 horas, sob agitação orbital, a 40°C; Meio substrato sólido composto por 2g de fonte de carbono acrescido de 4mL de água destilada, por 168 horas a 40°C.

#### 4.7 EFEITO DO pH INICIAL DE MEIO DE CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO DE PECTINASES POR *A. niveus*

Neste experimento, procurou-se verificar a influência do pH inicial do meio de cultura na produção de pectinases e crescimento de *A. niveus*.

O melhor pH inicial do meio para a produção enzimática foi de 3,0 e 5,0, para poligalacturonase e pectina liase, respectivamente, como ilustra a Figura 9. Além disso, o fungo teve excelente crescimento tanto em pHs alcalinos quanto ácidos (não mostrado). Vale ressaltar que em todos os cultivos o pH final encontrado ficou em torno de 8,7, sem que a enzima perdesse atividade neste pH elevado.

Em adição, observa-se a presença de pectina liase em pH neutro ou ligeiramente ácido, produzida pelo microrganismo, uma vez que seu pico de atividade ficou próximo à neutralidade.

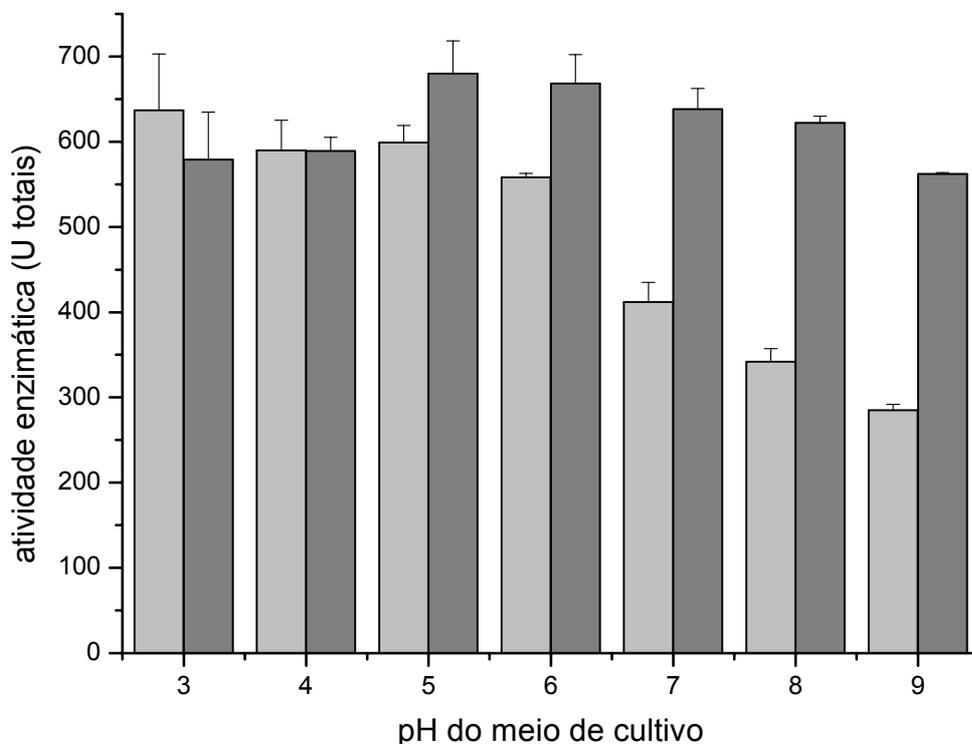


FIGURA 9: Efeito do pH inicial do meio de cultivo sobre a produção das enzimas. (A) Poligalacturonase (—) e Pectina Liase (—).

#### 4.8 EFEITO DA TEMPERATURA NO ENSAIO ENZIMÁTICO DA POLIGALACTURONASE

Em relação à temperatura ótima, como se pode observar na Figura 10, a atividade poligalacturonásica foi máxima a 55°C, tendo um decréscimo de 7% a 60°C. Esses resultados denotam uma boa aplicabilidade industrial da enzima sob temperaturas relativamente altas, como na indústria de sucos e bebidas, embora tenha apresentado queda de 63% a 80°C.

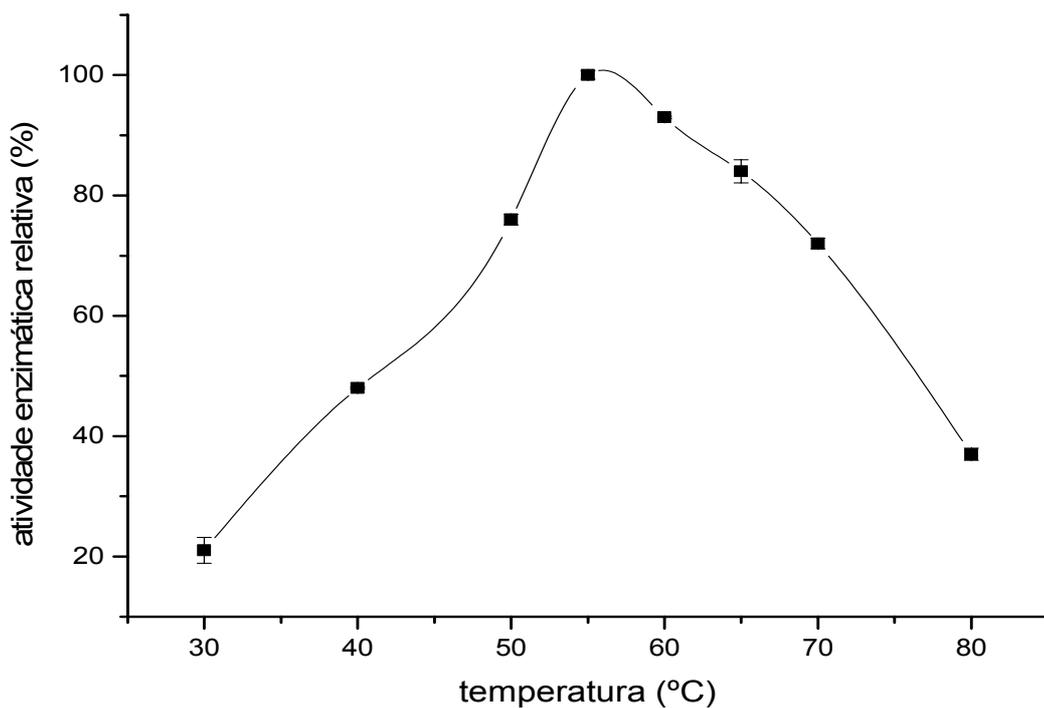


FIGURA 10: Efeito da temperatura para poligalacturonases produzidas por *A. niveus*.

#### 4.9 ESTABILIDADE TÉRMICA DA POLIGALACTURONASE NOS ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Um dos parâmetros mais importantes para ser investigado quando se estuda uma enzima com aplicação industrial é a termoestabilidade. Dessa forma, a enzima foi incubada na ausência de substrato (polipectato de sódio), por 30 minutos, a diferentes temperaturas. Observa-se na Figura 11 que a enzima em estudo apresentou estabilidade até 60°C, ocorrendo queda de 36% à temperatura de 70°C e 96% a 80°C. Este resultado é bastante satisfatório quando comparado à literatura e sugere que o *A. niveus* tem um bom potencial biotecnológico.

Um outro ensaio que foi realizado investigou o tempo de estabilidade em relação as temperaturas de 60, 65 e 70°C. De acordo com a Figura 12, observa-se que a enzima foi estável por uma hora e trinta minutos a 60°C, apresentando uma ligeira queda de 9% em sua atividade ao final desse tempo. No entanto, com apenas 10 minutos de incubação a enzima perdeu 50% de sua atividade a 65°C, tendo uma queda de 94% com trinta minutos de incubação. Na temperatura de 70°C, com apenas 10 minutos, a enzima perdeu 89% de sua atividade. Esses dados revelaram a baixa estabilidade da poligalacturonase produzida por *A. niveus* à temperaturas superiores a 60°C, o que denota uma limitada aplicabilidade industrial para essa enzima em tratamentos submetidos à temperaturas superiores a esta. No entanto, na indústria têxtil e de lavagem industrial, essas enzimas teriam uma ótima atuação, uma vez que esses processos utilizam temperaturas mais amenas.

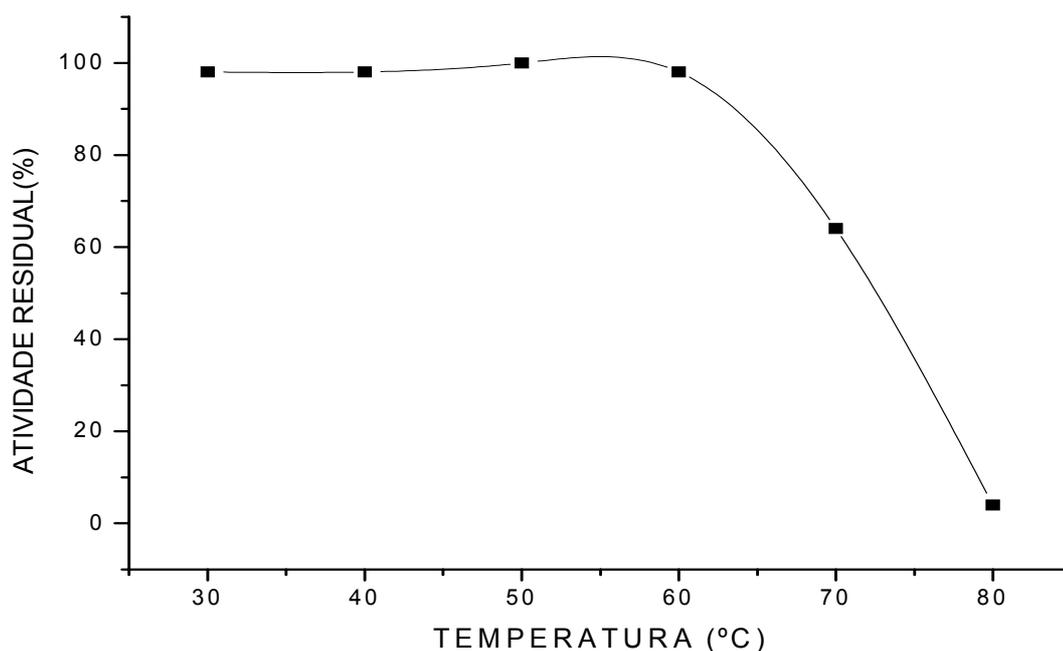


FIGURA 11: Estabilidade térmica da poligalacturonase em diferentes temperaturas na ausência de substratos.

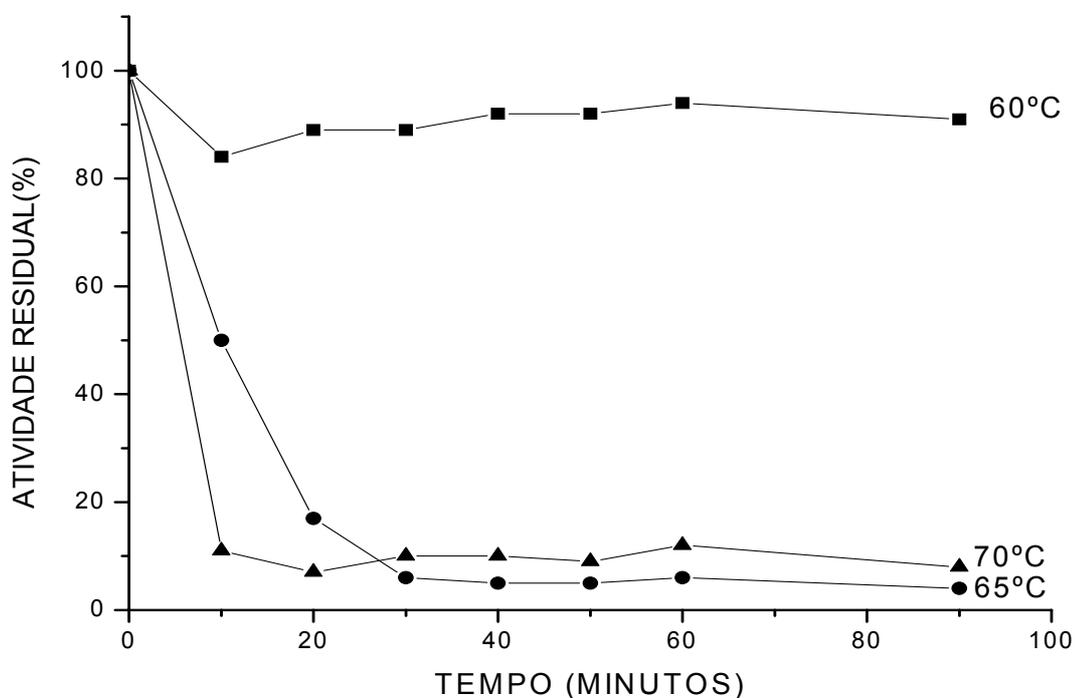


FIGURA 12: Estabilidade térmica da poligalacturonase em função do tempo de incubação na ausência de substratos. Símbolos 60°C (■), 65°C (●) e 70°C (▲), sem a presença do substrato.

#### 4.10 EFEITO DO pH NO ENSAIO ENZIMÁTICO DA POLIGALACTURONASE

Outro parâmetro analisado foi o efeito do pH na atividade de poligalacturonase. De acordo com a Figura 13, verificou-se que a poligalacturonase bruta de *A. niveus* apresentou dois platôs de atividade, um situado entre o pH 3,0 e 4,5 e outro entre o pH 5,0 e 6,5. O pH ótimo foi de 4,0.

Isto sugere a presença de mais de uma poligalacturonase no extrato bruto, com pHs ótimos distintos.

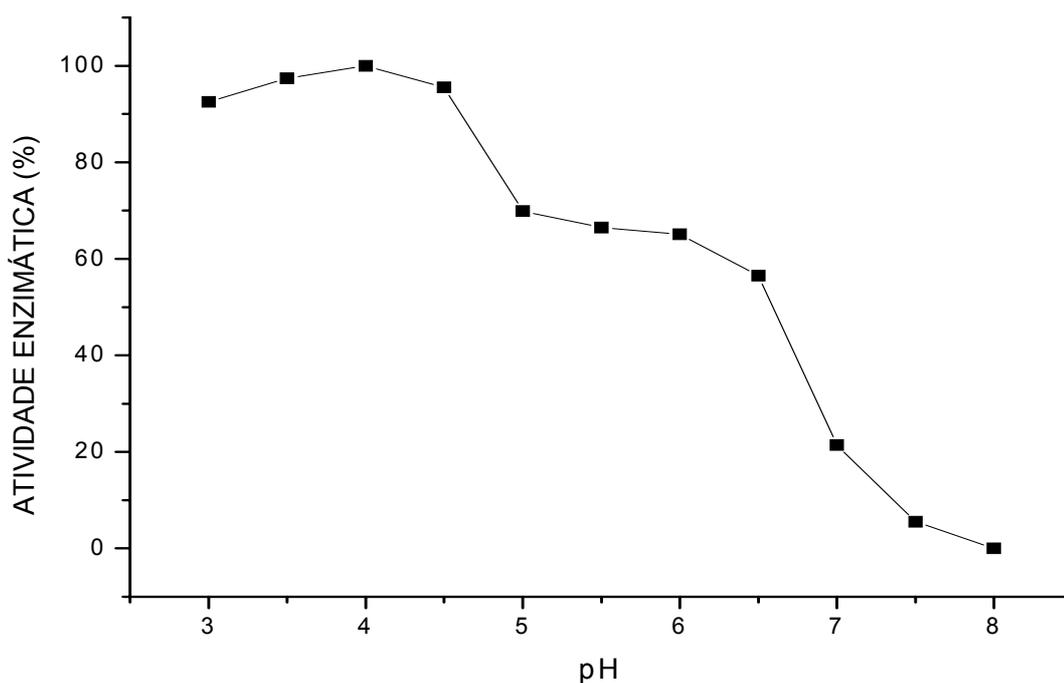


FIGURA 13: Influência do pH na atividade da poligalacturonase produzida por *A. niveus*.

#### 4.11 ESTABILIDADE AO pH DA POLIGALACTURONASE

A poligalacturonase de *A. niveus* foi estável por 24 horas em geladeira numa faixa que compreende do pH 3,0 ao pH 5,0, tendo uma queda de 15% de atividade no pH 5,5 e 91% no pH 8,0, como mostra a Figura 14. Assim como relatado anteriormente, esses resultados ressaltam os indícios da presença de poligalacturonases ácidas. Tendo estas uma boa estabilidade em pHs extremamente baixos, elas possuem um excelente potencial para aplicação em processos industriais ácidos.

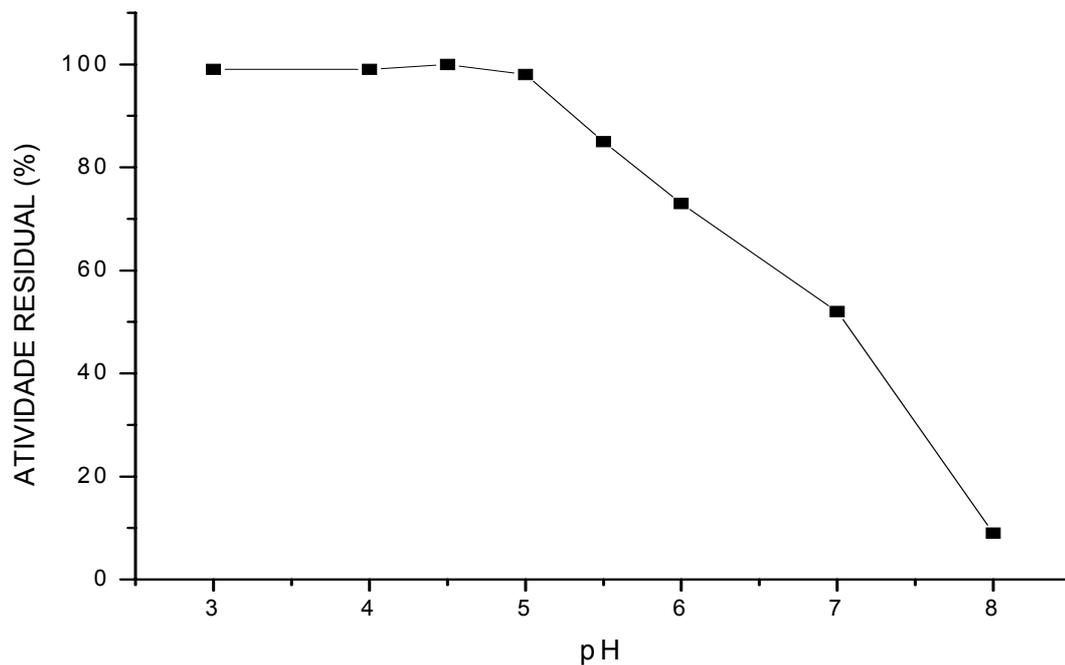


FIGURA 14: Estabilidade ao pH da poligalacturonase de *A. niveus*.

#### 4.12 EFEITO DA ADIÇÃO DE ÍONS À MISTURA DE REAÇÃO, SOBRE A ATIVIDADE DA POLIGALACTURONASE

A atividade de muitas enzimas pode ser fortemente influenciada pela presença de diferentes íons durante a reação de catálise, agindo como cofatores ou inibidores. Em virtude disso, verificou-se a influência de vários íons e EDTA na atividade da poligalacturonase presente no extrato bruto.

A Tabela 6 ilustra os efeitos provocados pelos diferentes compostos, onde destaca-se o aumento da atividade enzimática na presença de EDTA 1mM (10%) e de manganês 1 e 10mM (16% e 12%, respectivamente). O aumento na atividade com EDTA provavelmente deve-se ao fato de este quelar os inibidores do extrato, impedindo-os de influenciar negativamente na reação enzimática. Em contrapartida, o aumento da atividade na presença de manganês seria pelo fato de este agir como um cofator durante a reação enzimática.

Tabela 6: Efeito da adição de íons e EDTA à mistura de reação, sobre a atividade da poligalacturonase bruta.

Íons/Compostos	Atividade Residual (%)	
	1mM	10mM
Sem adição	100	100
Hg <sup>++</sup>	62 ±13	5 ±2
Zn <sup>++</sup>	88 ±2	74 ±7
Ba <sup>++</sup>	103 ±5	40 ±8
Cu <sup>++</sup>	62 ±0,3	23 ±0,3
Na <sup>+</sup>	95 ±1	92 ±6
Mg <sup>++</sup>	103 ±9	86 ±12
Mn <sup>++</sup>	116 ±4	112 ±13
Ca <sup>+</sup>	98 ±7	78 ±6
Al <sup>-</sup>	99 ±2	93 ±3
NH <sub>4</sub> <sup>-</sup>	88 ±5	86 ±6
EDTA	110 ±1	93 ±11

#### 4.13 EFEITO DA TEMPERATURA NO ENSAIO ENZIMÁTICO DE PECTINA LIASE

A atividade de pectina liase a 30°C apresentou-se relativamente baixa, como se pode observar na Figura 15. No entanto, a atividade máxima se encontra em temperaturas mais elevadas, com pico em 55 °C, tendo um decréscimo acentuado de 30% a 60°C.

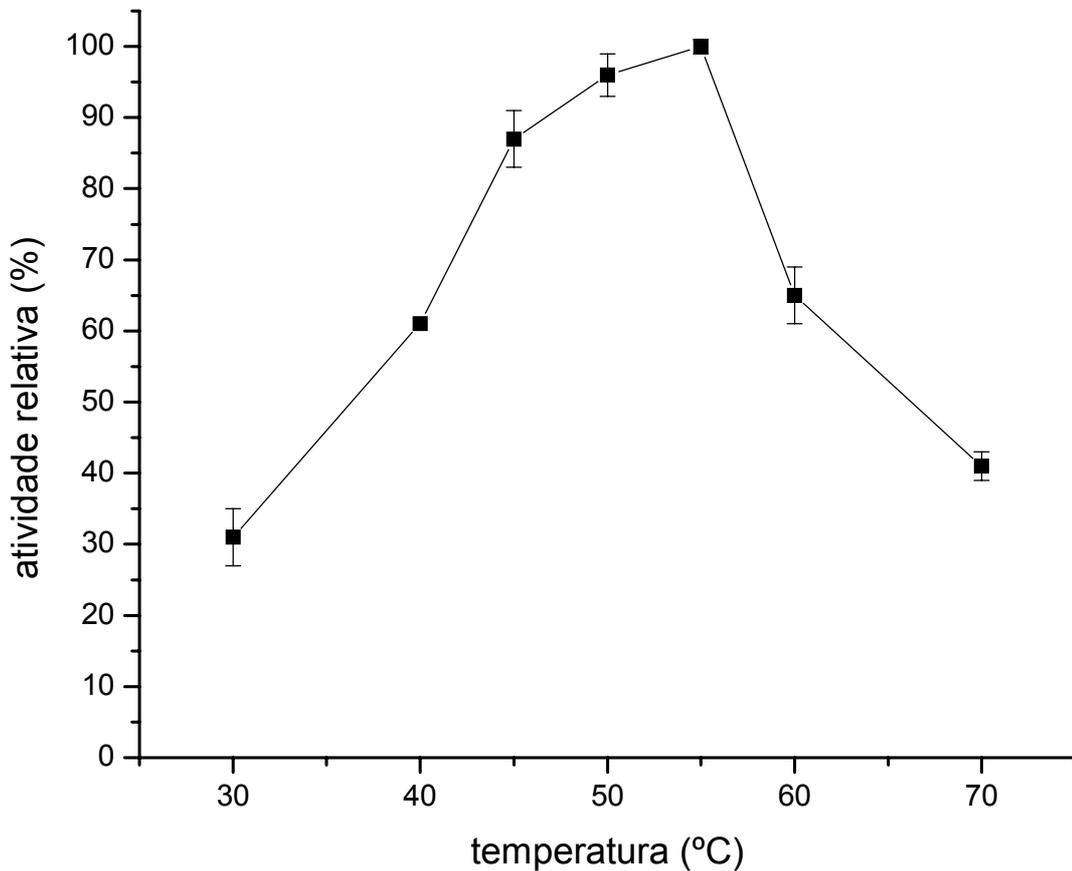


FIGURA 15: Efeito da temperatura para pectina liase produzida por *A. niveus*.

#### 4.14 ESTABILIDADE TÉRMICA NO ENSAIO ENZIMÁTICO PARA PECTINA LIASE

Neste experimento, além de verificar-se a estabilidade da pectina liase na ausência de substrato, examinou-se o comportamento dessa enzima com a adição de glicerol, polietilenoglicol (PEG), trealose e sorbitol. Observa-se na Figura 16 que a enzima em estudo apresentou pouca estabilidade sem a adição de nenhum composto, com queda de 100% de atividade a 70°C. Além disso, pode-se observar que PEG e trealose são excelentes aditivos para manter a atividade enzimática da pectina liase a 50, 60 e 70°C, respectivamente.

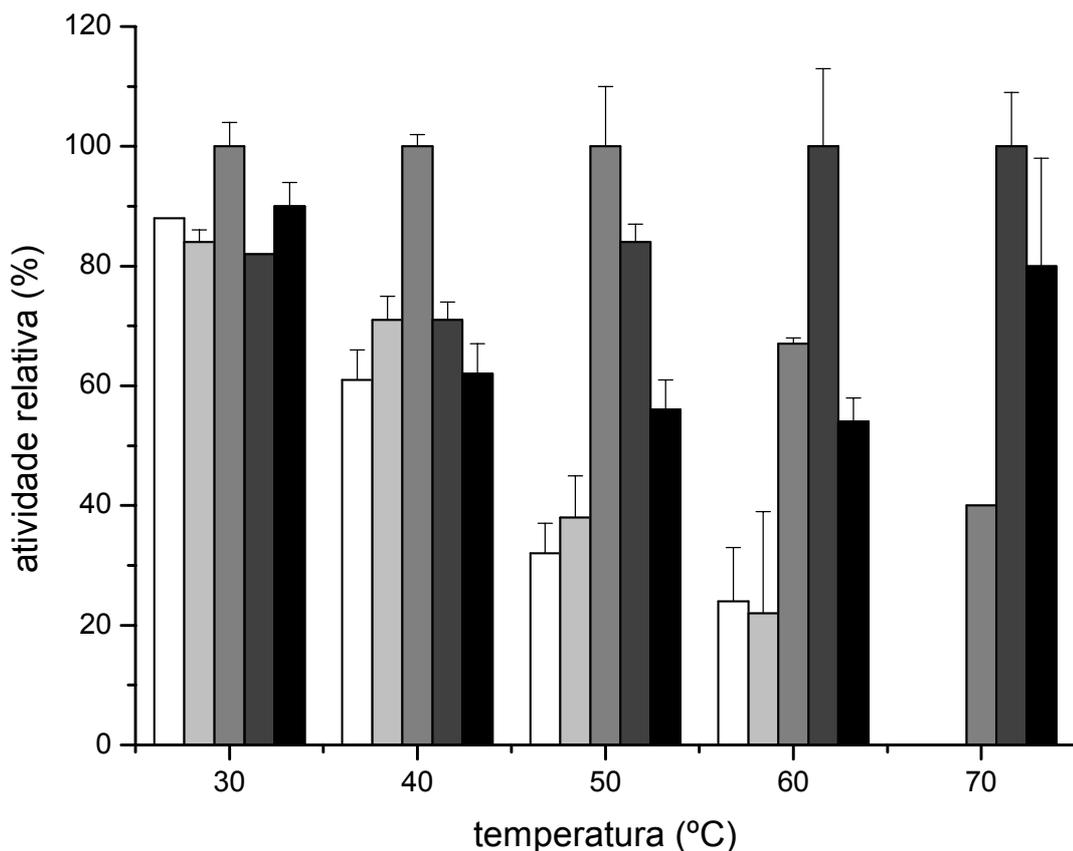


FIGURA 16: Estabilidade térmica da pectina liase em função da temperatura de incubação. Símbolos (□) somente a enzima, (■) glicerol, (■) PEG, (■) trealose e (■) sorbitol.

#### 4.15 PURIFICAÇÃO DAS POLIGALACTURONASES EXTRACELULARES

Para a purificação de pectinases extracelulares optou-se por obter a enzima cultivando o fungo em meio Czapeck, pois nesta condição a enzima apresentou alta atividade específica com poucos interferentes. Durante o processo de purificação, o extrato bruto foi dialisado por 24 horas a 4°C, em tampão Tris-HCl 10mM pH 7,5, e posteriormente aplicado em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-celulose. As poligalacturonases ficaram aderidas à resina DEAE-celulose e foram eluídas com um gradiente de NaCl em tampão de eluição. O pico máximo de atividade foi eluído com aproximadamente 0,3M de NaCl, ilustrado pela Figura 17. Posteriormente, as frações contendo as maiores atividades enzimáticas foram reunidas, como indicado pelas setas, dialisadas e liofilizadas.

Em seguida, a amostra foi ressuspensa, em tampão acetato de sódio 100mM pH 4,0, e aplicada em coluna de filtração Biogel P-100, eluída pelo mesmo tampão, sendo separada em dois picos de atividade praticamente livre de contaminantes, observado na Figura 18. Este processo resultou em uma enzima purificada e outra semi purificada com recuperação de 5% para ambas (Tabela 7). Padronizou-se a pectinase presente no pico I como PGPI e a do pico II como PGPII.

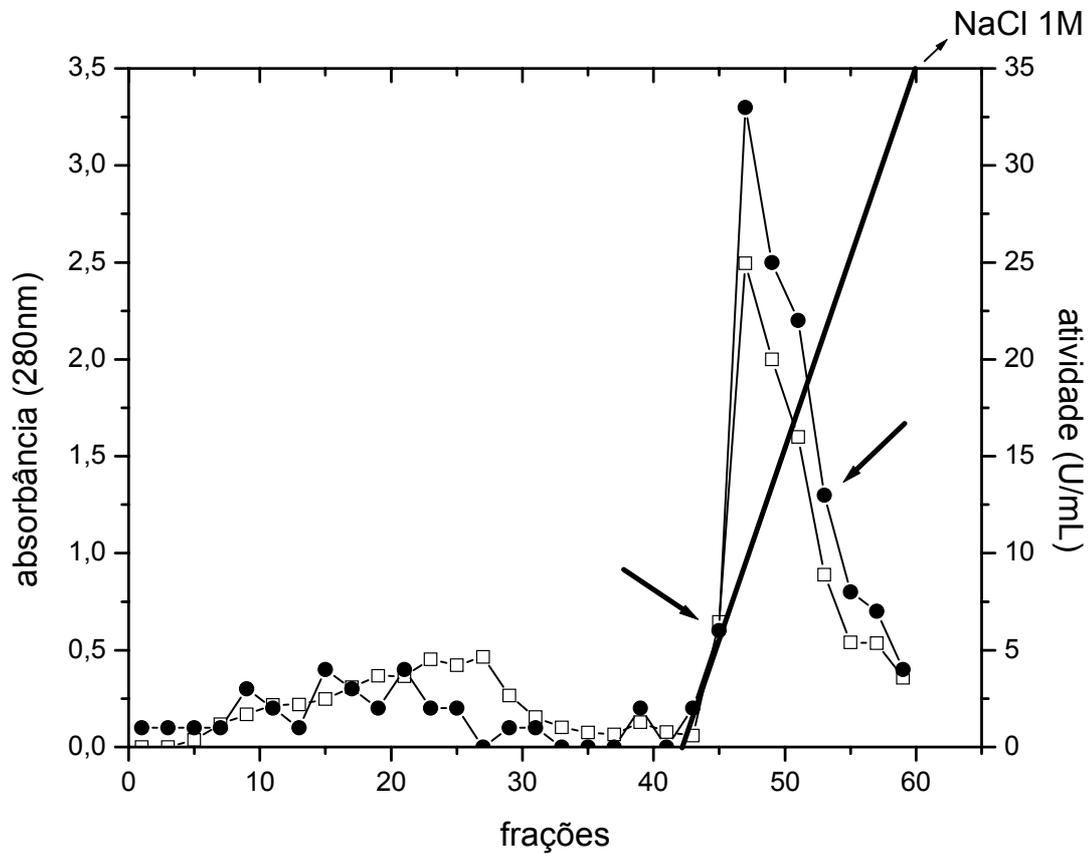


FIGURA 17: Perfil da poligalacturonase em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose eluída com gradiente 0-1M NaCl em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7.5. Símbolos: (●) atividade; (□) proteína; (—) gradiente de NaCl. As setas indicam as frações que foram coletadas.

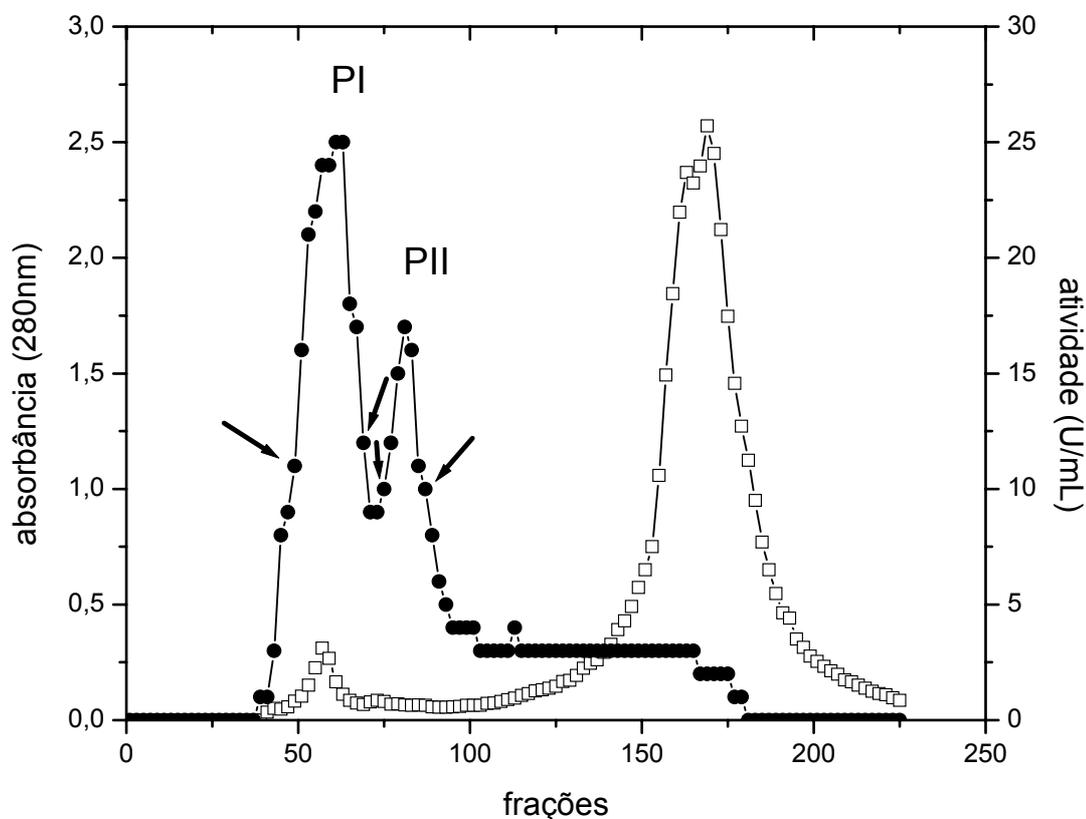


FIGURA 18: Perfil das poligalacturonases em coluna de gel-filtração Biogel P-100. Símbolos: (●) atividade; (□) proteína. As setas indicam as frações que foram coletadas.

TABELA 7: Passos da purificação de poligalacturonase de *A. niveus*.

	Volume (mL)	Proteína (mg totais)	Atividade (U totais)	Atividade específica (U/mg proteína)	Recuperação (%)	Fator de purificação (vezes)
Extrato- bruto	230	101	5290	52	100	1
DEAE- celulose	70	29	1750	60	33	1
Biogel P100 <i>Pico I</i>	21	4	273	62	5	1
Biogel P100 <i>Pico II</i>	15	2	240	160	5	3

#### 4.16 CRITÉRIO DE PUREZA

O critério de pureza utilizado foi a análise eletroforética das enzimas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Conforme pode ser visto na Figura 19 a pectinase PGPI exibe uma única banda, comprovando sua pureza, e a PGPII apresenta duas bandas. Além disso, a Figura 20 ilustra a atividade pectinolítica da poligalacturonase PGPI em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes, onde após a corrida eletroforética, o gel foi incubado em solução contendo 1% de polipectato de sódio em tampão acetato de sódio 100mM pH 4,0 a 50°C por 2 horas e corado com vermelho de rutênio.

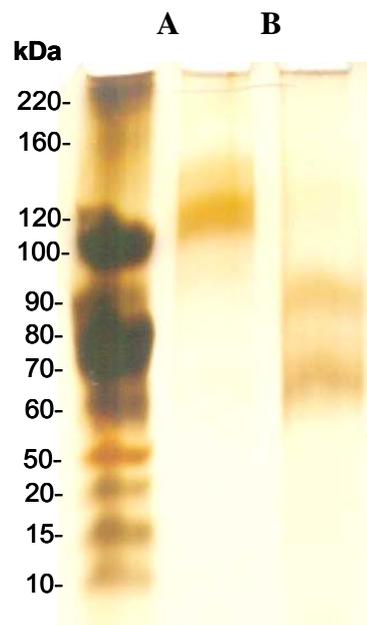


Figura 19: Perfil eletroforético em SDS-PAGE 10% pH 8,3 das poligalacturonases. (M) Marcador molecular; (A) PGPI e (B) PGPII. Coloração com nitrato de prata.

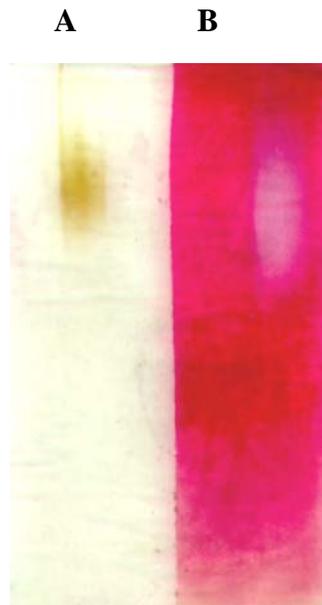


Figura 20: Atividade da PGPI em PAGE 12% pH 8,3. (A) PAGE; coloração com nitrato de prata; (B) gel de atividade; coloração com vermelho de rutênio.

#### 4.17 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA PGPI

Foram testados dois métodos para determinar a massa molecular da poligalacturonase extracelular (PGPI), SDS-PAGE confirmado por FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).

Primeiramente padrões foram aplicados no SDS-PAGE, juntamente com a enzima, permitindo traçar uma reta padrão na qual poderia ser estimada a massa molecular da proteína em estudo. Segundo a Figura 21, o valor de log da massa molecular da PGPI foi em torno de 2,09, sendo que o valor calculado foi aproximadamente 123kDa.

Para confirmar esses dados, a PGPI foi aplicada em uma coluna Bio-Sil-Sec-400, em FPLC BioRad model 2800-Solvent Delivery System, utilizando gamaglobulina bovina (158kDa), ovoalbumina (44kDa) e mioglobulina (17kDa) como padrões. A Figura 22 ilustra que o tempo de retenção da PGPI na coluna foi de 9,59

minutos e, extrapolando esse dado na reta padrão, obteve-se a massa molecular de 102,6kDa para a enzima.

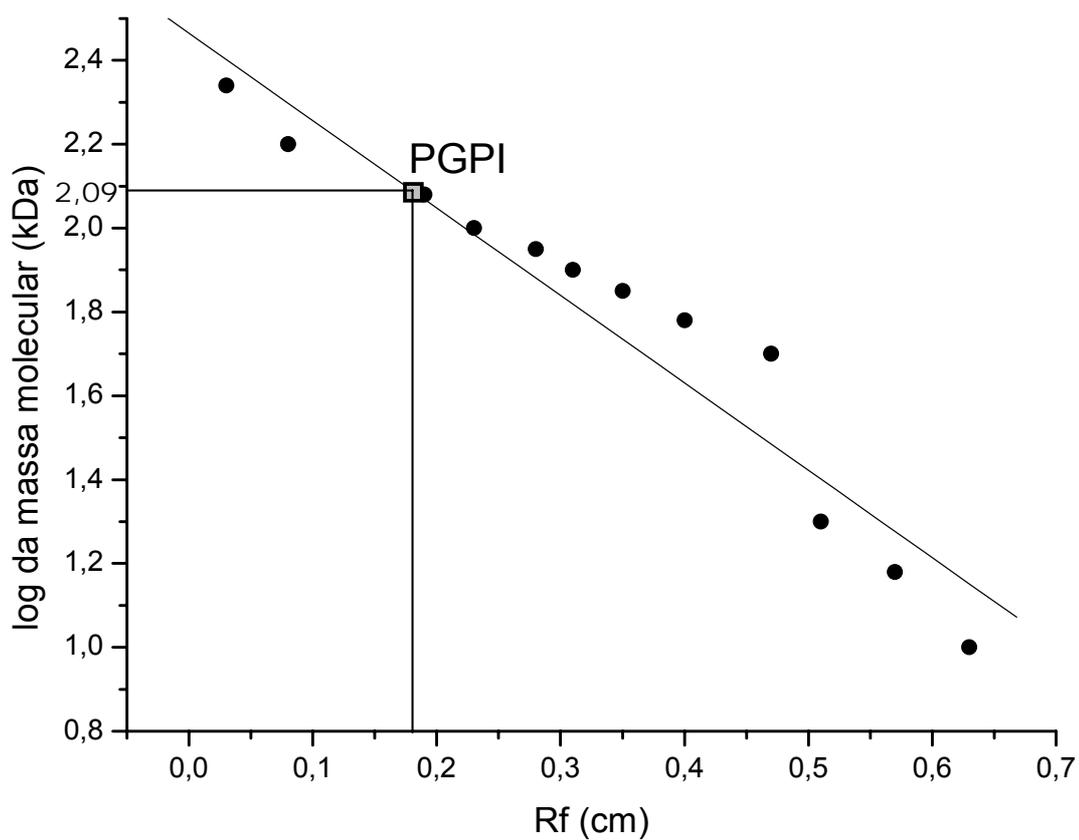


Figura 21: Determinação da massa molecular da PGPI em SDS-PAGE. (●) Padrões moleculares; (□) PGPI.

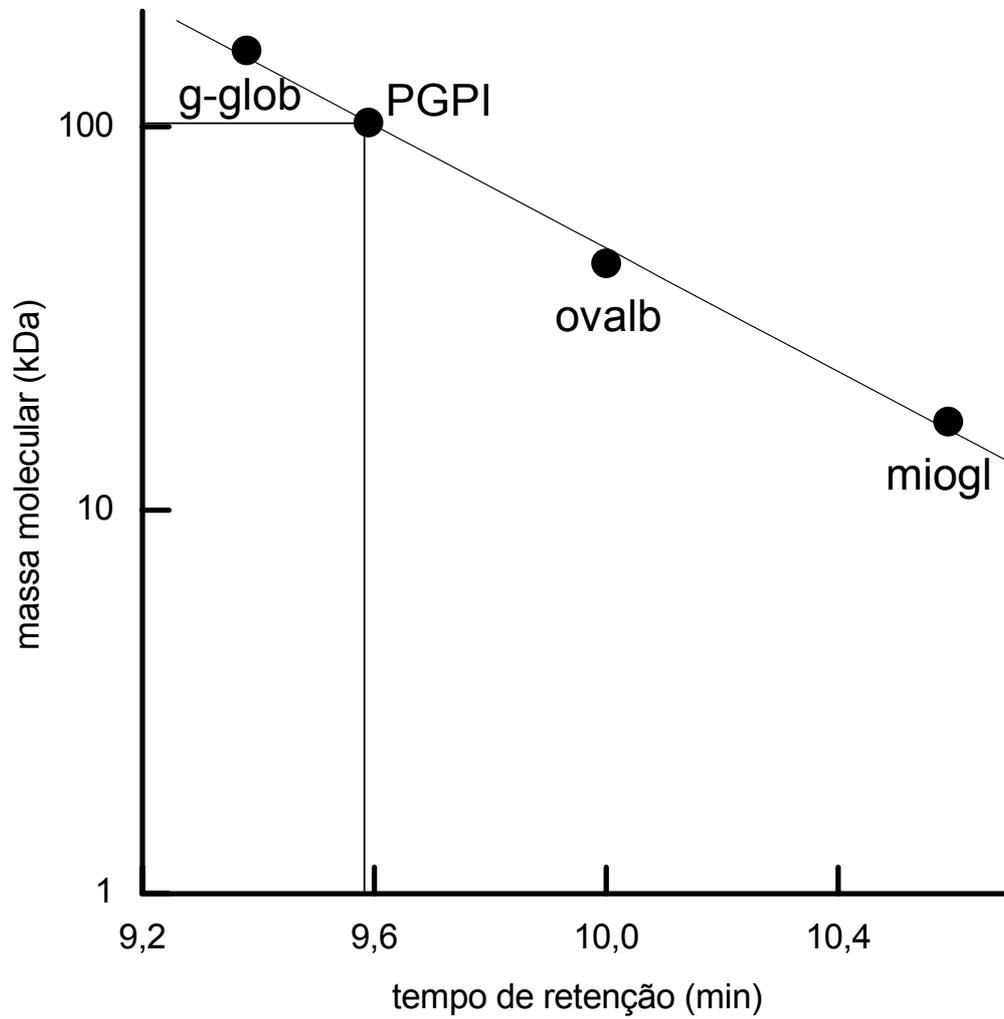


Figura 22: Determinação da massa molecular da PGPI em FPLC. (g-glob) gamaglobulina bovina; (ovalb) ovoalbumina; (miogl) mioglobulina.

#### 4.18 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE HIDRÓLISE DA PGPI EM CROMATOGRAFIA DE SÍLICA EM CAMADA DELGADA

A análise dos produtos de hidrólise pode mostrar resultados interessantes para se classificar uma enzima como endo ou exopoligalacturonase. Nesse experimento, incubou-se a proteína com o substrato por variados tempos a 55°C. No cromatograma obtido, Figura 23, pode-se verificar que a enzima PGPI liberou somente ácido monogalacturônico, em qualquer um dos tempos observados. Dessa forma, pode-se concluir que trata-se de uma exopoligalacturonase, uma vez que esta atua nas extremidades da cadeia do polipectato de sódio liberando monossacarídeos.

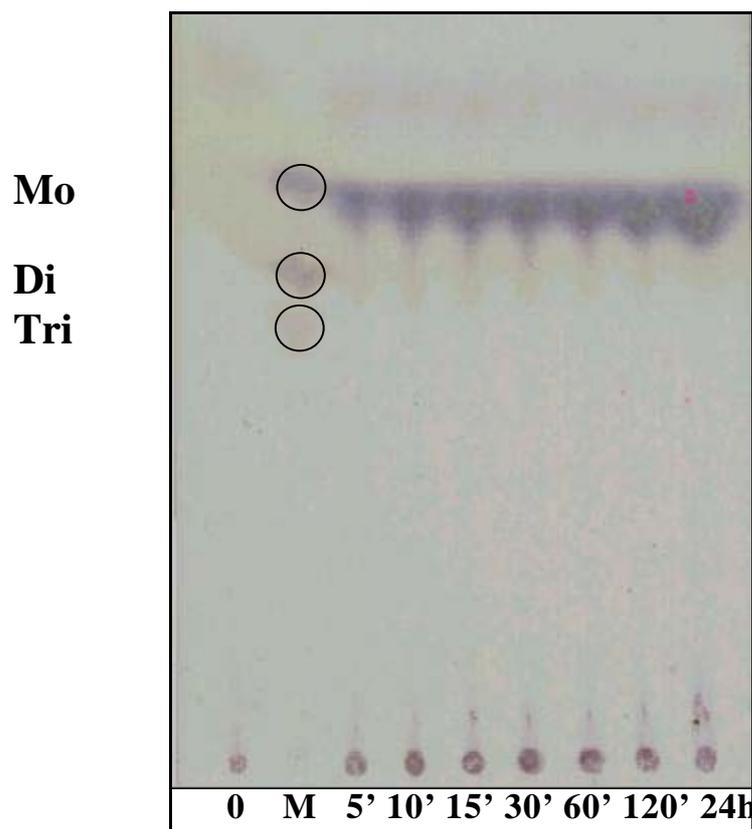


Figura 23: Produtos de hidrólise da enzima PGPI em diferentes tempos. (M) marcadores; (Mo) monogalacturônico; (Di) digalacturônico; (Tri) trigalacturônico.

#### 4.19 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE O ENSAIO ENZIMÁTICO DA PGPI

Como demonstrado na Figura 24, a temperatura ótima da atividade poligalacturonásica da enzima PGPI purificada ficou entre 50 e 55°C, tendo queda de 33% a 60° e de 68% a 70°C.

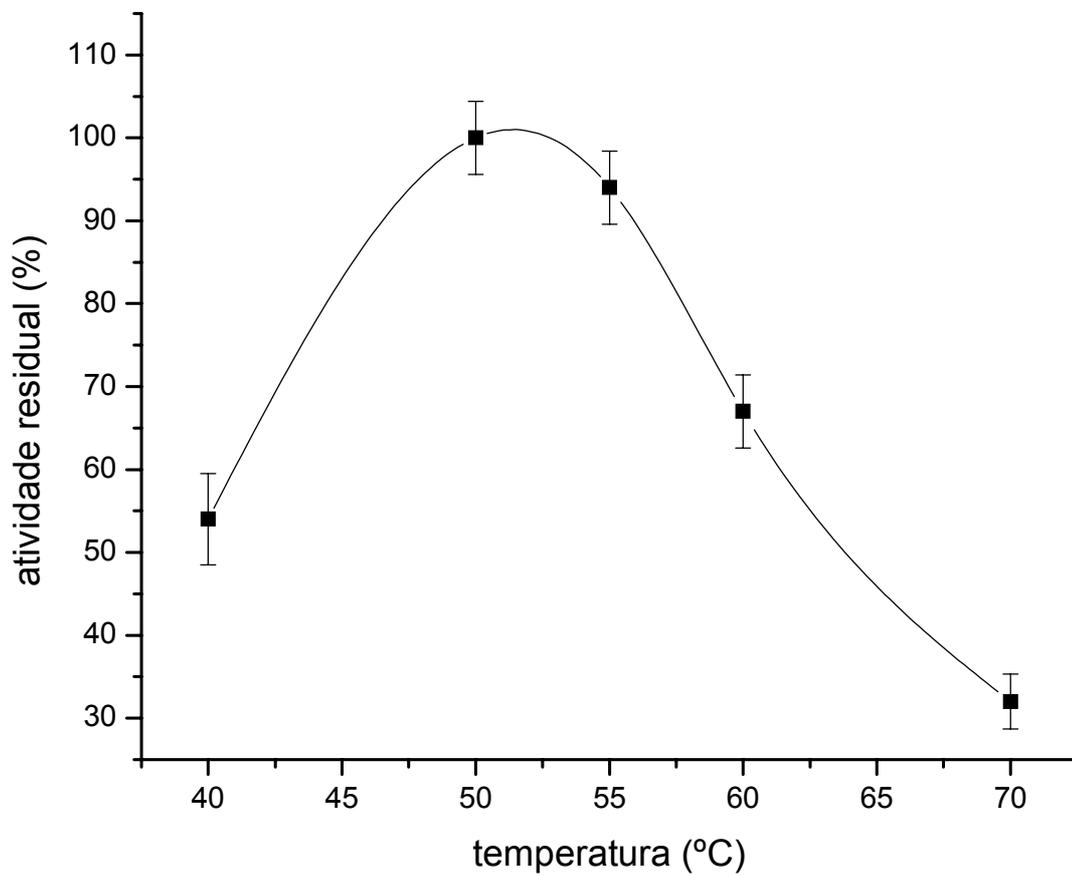


FIGURA 24: Efeito da temperatura para PGPI produzida por *A. niveus*.

#### 4.20 ESTABILIDADE TÉRMICA DA PGPI NOS ENSAIOS ENZIMÁTICOS

As pectinases termoestáveis possuem alto interesse industrial, visto que o tratamento de chás, café e outras bebidas ocorrem preferencialmente em altas temperaturas. Desta forma analisou-se a termoestabilidade da PGPI purificada, na ausência de substrato, em diferentes temperaturas por tempos variados. Observa-se na Figura 25 que a enzima em estudo apresentou boa estabilidade a 50°C, apresentando uma ligeira queda de 13% em sua atividade com 60 minutos de incubação. No entanto, com apenas 10 minutos de incubação a enzima perdeu 33% de sua atividade a 55°C e 43% a 60 e 65°C.

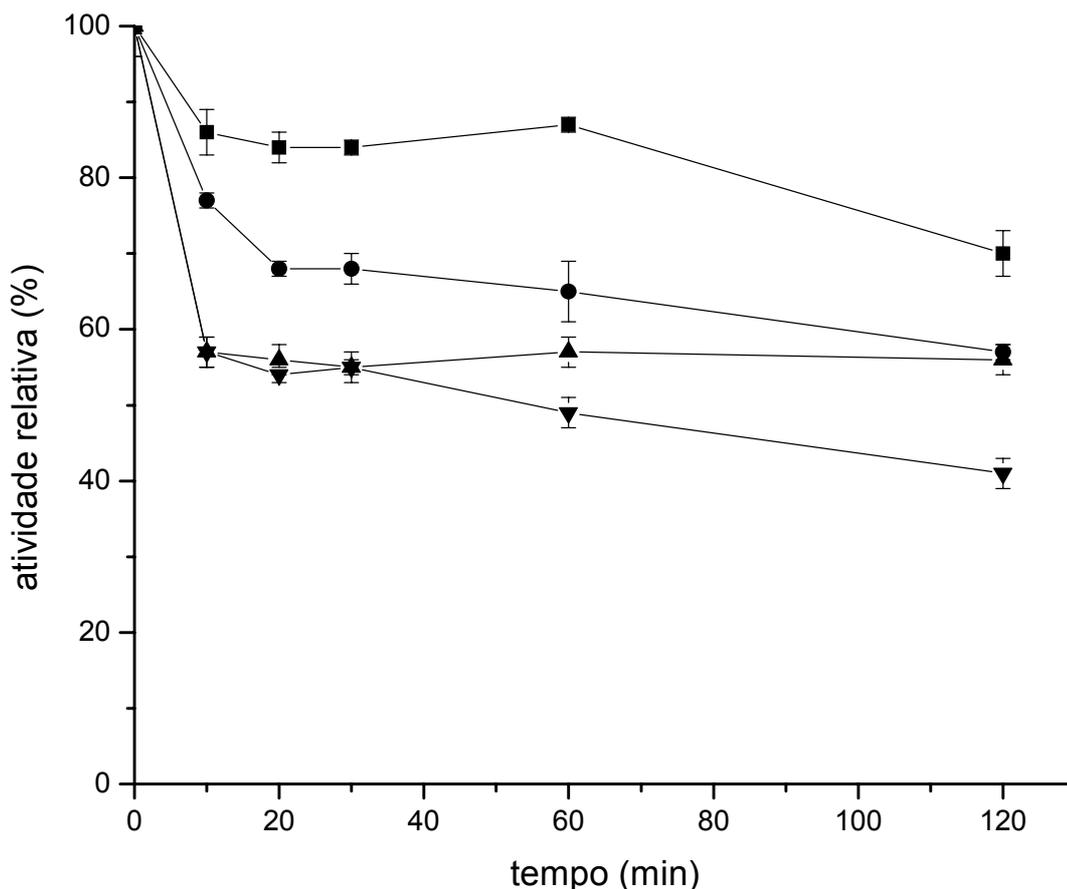


FIGURA 25: Estabilidade térmica da PGPI em diferentes temperaturas e em função do tempo de incubação na ausência de substratos. Símbolos 50°C (■), 55°C (●), 60°C (▲) e 65°C (▼), sem a presença do substrato.

#### 4.21 EFEITO DO pH SOBRE O ENSAIO ENZIMÁTICO DA PGPI

Em relação ao pH ótimo de ensaio, foi analisada uma faixa de pH de 3,0 até 8,0. Nestas condições, a PGPI apresentou excelente desempenho. Neste experimento, ao invés da enzima gerar apenas um ponto de pH ótimo, ela atuou em uma faixa de pH ótimo, abrangendo desde o pH 4,0 até 6,5, como pode ser observado na Figura 26. Observou-se que aumentando o pH de 3,5 para 4 ocorreu um aumento de 29% na atividade, ocorrendo queda de 16% aumentando-se de 6,5 para 7, apresentando atividade de 57% em pH 8,0. Portanto, estes resultados apontam esta poligalacturonase com uma primorosa enzima para atuar em diversos processos industriais, como alimentícios, de sucos e têxteis.

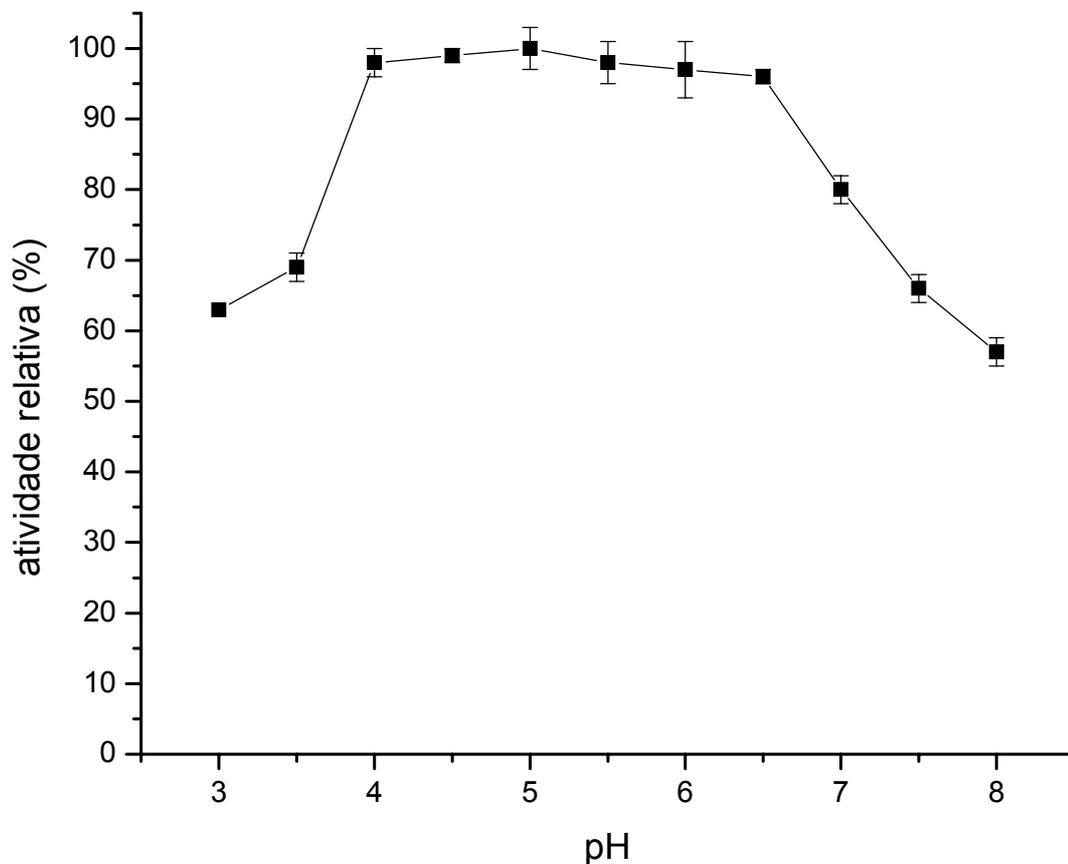


FIGURA 26: Influência do pH na atividade da PGPI purificada de *A. niveus*.

#### 4.22 ESTABILIDADE AO pH DA PGPI

Ao analisar a estabilidade ao pH, alíquotas da PGPI foram deixadas em tampão McIlvaine, em diferentes pHs, por 24 horas a 4-6°C. Ao final desse período, a enzima apresentou excelente estabilidade em pH 6,5 com queda de aproximadamente 10% em pHs imediatamente superiores e inferiores, observado na Figura 27. Além disso, a enzima não apresentou atividade inferior a 70%, mesmo no menor pH analisado.

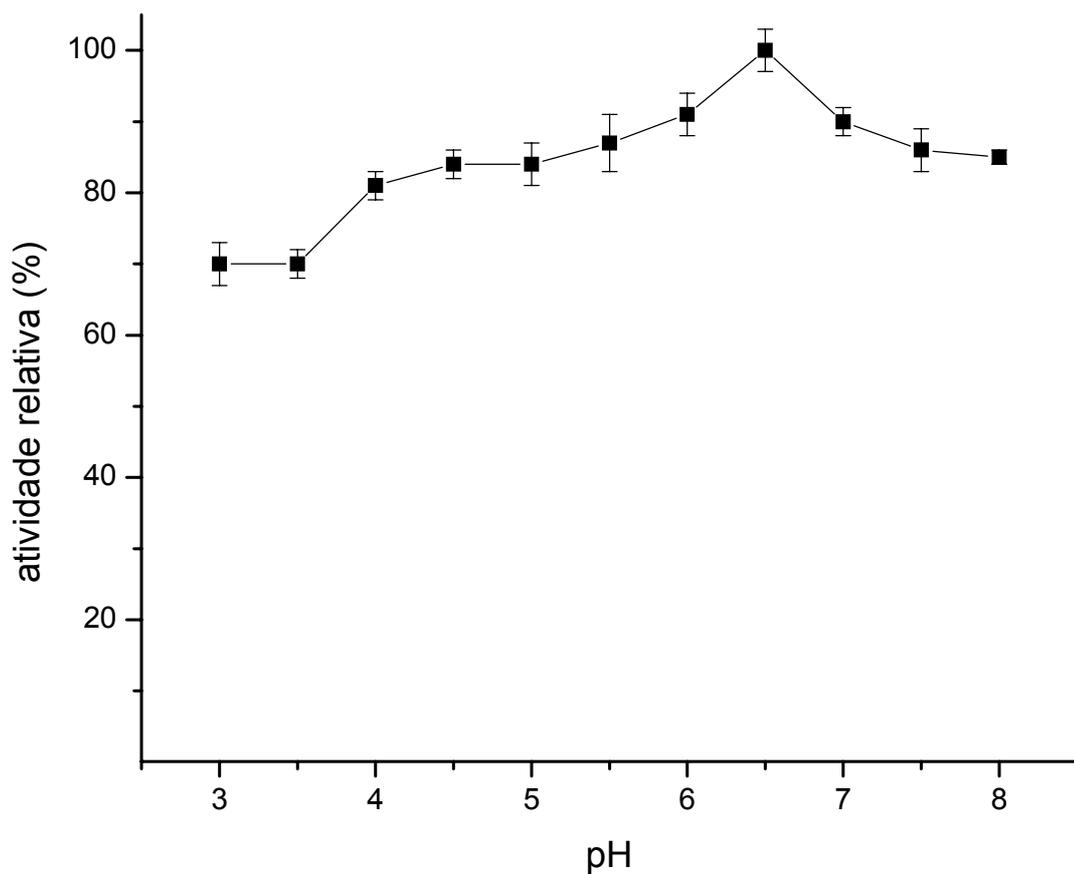


FIGURA 27: Estabilidade ao pH da PGPI de *A. niveus*.

#### 4.23 ESTUDO CINÉTICO DA PGPI

Após os experimentos de purificação enzimática, foi conduzida a caracterização da PGPI, a fim de otimizar sua atividade. Para isso, foi necessário verificar a cinética da enzima, na qual utilizou-se polipectato de sódio SIGMA® como substrato. A Figura 28 ilustra que a PGPI se comporta como uma enzima michaeliana. A Tabela 8 mostra os valores de  $K_m$ ,  $V_{m\acute{a}x}$  e eficiência catalítica da enzima, obtidos através do programa Enzyplot.

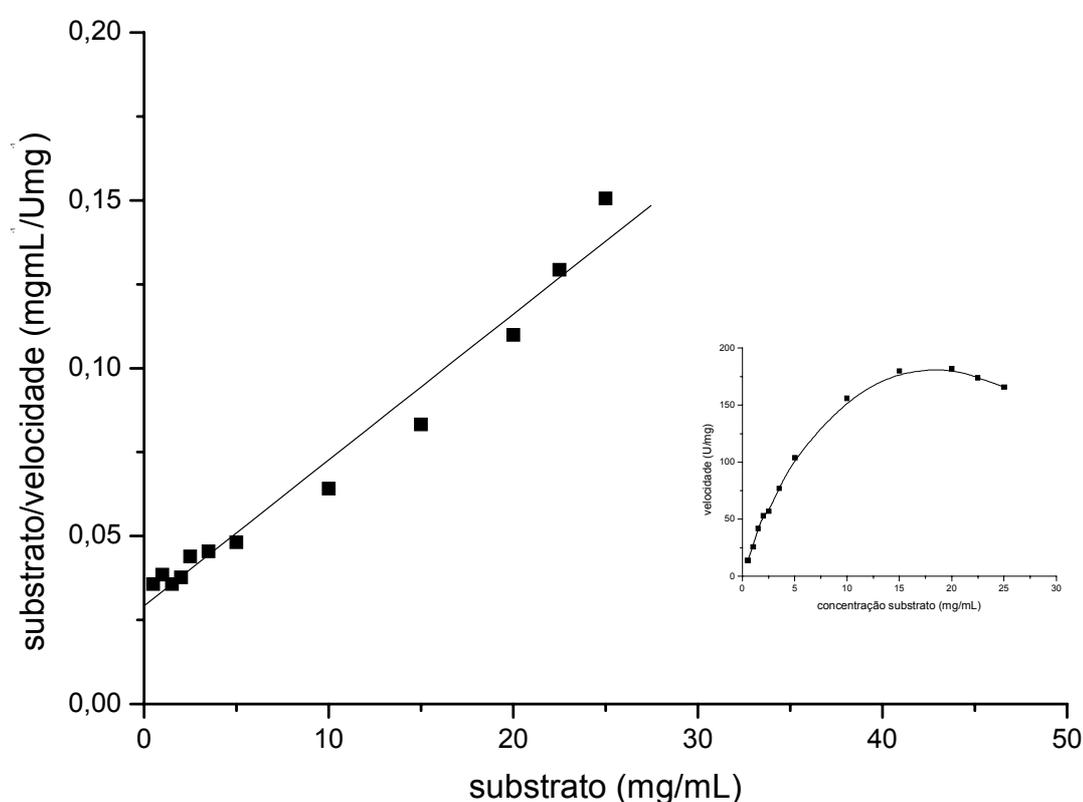


FIGURA 28: Projeção de Hanes.

Tabela 8: Constantes cinéticas da PGPI.

Substrato	$K_m$ (mg/mL)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg prot)	$V_{m\acute{a}x}/K_m$
Polipectato de sódio	6,7	230	34,3

#### 4.24 EFEITO DA ADIÇÃO DE ÍONS À MISTURA DE REAÇÃO, SOBRE A ATIVIDADE DA PGPI

O efeito de alguns íons metálicos nas concentrações finais de 0,5mM, 1mM e 10mM foram investigados para verificar sua influência sobre a atividade da PGPI. Como ilustrado na Tabela 9, a atividade poligalacturonásica foi altamente ativada na presença de 10mM de  $Mn^{++}$ , com aumento de 232% em relação ao ensaio sem adição de íons. Além disso, 0,5mM de  $F^-$  e  $K^+$  aumentaram a atividade em 69% e 65%, respectivamente.

Por outro lado, 10mM de metais pesados como  $Pb^{++}$  e  $Ba^{++}$  inibiram a atividade em 57% e 39%, respectivamente. Os demais metais tiveram pouca ou nenhuma influência sobre a atividade enzimática.

Tabela 9: Efeito da adição de íons, na mistura de reação, sobre a atividade da PGPI.

Íons	Atividade Residual (%)		
	0,5mM	1mM	10mM
Sem adição	100 ± 0,2	100 ± 3,9	100 ± 2,3
$Mg^{++}$	102 ± 3,7	105 ± 6,0	97 ± 2,2
$Mn^{++}$	136 ± 6,4	102 ± 1,6	332 ± 7,9
$Cu^{++}$	115 ± 1,7	101 ± 1,7	93 ± 5,0
$Hg^{++}$	125 ± 5,6	103 ± 2,8	98 ± 3,8
$Ba^{++}$	153 ± 2,3	97 ± 0,8	61 ± 3,5
$Co^{++}$	113 ± 7,8	104 ± 4,6	93 ± 3,8
$Br^{++}$	86 ± 6,8	106 ± 2,8	110 ± 3,4
$Pb^{++}$	126 ± 4,5	94 ± 3,2	43 ± 2,6
$Zn^{++}$	133 ± 2,9	98 ± 4,7	108 ± 1,2
$K^+$	165 ± 2,7	101 ± 0,5	117 ± 4,7
$F^-$	169 ± 6,6	111 ± 0,1	117 ± 0,4
$NH_4^-$	125 ± 6,8	109 ± 3,8	113 ± 3,6

#### 4.25 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS

Através do método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) foi verificada a natureza glicoprotéica da PGPI de *A. niveus*. O conteúdo de carboidratos foi estimado em 37,7%.

#### 4.26 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO

O ponto isoelétrico da PGPI foi determinado após focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida, usando anfólitos Pharmalite com pH de 3,0 a 7,5. Com este procedimento, obteve-se o valor em torno de 5,4 para a enzima.

#### 4.27 SEQUENCIAMENTO DA PGPI

O seqüenciamento da porção N-terminal, utilizando a metodologia da Degradação de Edman, revelou que a poligalacturonase purificada PGPI possui a seguinte seqüência de aminoácidos: Ser-Pro-Pro-Ala(Tre)-Val-Ile. Assim, o fragmento obtido foi comparado com um banco de dados, através do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), possibilitando a comparação entre a seqüência da poligalacturonase PGPI de *A. niveus* com outras pectinases já seqüenciadas.

O seqüenciamento de aminoácidos da PGPI apresentou homologia com uma exopoligalacturonase de *Aspergillus fumigatus* e *Neosartorya fischeri*, além de uma proteína hipotética de *Aspergillus terreus* e *Aspergillus niger*, ilustrados na Figura 29.

## A

```

1 mkffalaalf astvnsiavd glipgarvip andvvalkka gayhqkhhhr rtviirssss
61 deddvsadfl wgikranhgg rlllqngkky vigkkldltf lkdievqldg elkvlpkil
121 dpvlagvnti ekftndvpyw qannfyydfq ksisfwrwg edikifgsgv lngngqrwyn
181 efaggeildp nnkyyrpilf vtenatrsvs vtenatrsvs egitqlnspc wtnffvrtkd isfdnvfiha
241 ystnasalpk ntdgfdtlv dgltvtntv digddclspk pnttnvfkn lwcngthgas
301 mgsigqypgv ldienvwie nvtllngeng arlkawagpd vgygrinnvt yknihventd
361 npivldqcyf ninatqcaay psrvnftniv fediygtssg krgkvvadlt cspnavcsgi
421 rlknihltsp agsppvivcd giqgdigvec qsssnsttrr svdlarslky ra

```

## B

```

1 mkflalaalf astvssiavd glipgarvip andvvalkv gahhqkphr rtviirpsfn
61 deddvsadfl wgikwanrgg rlllqkgkky vigkkldltf lkdievqldg elkftndvpy
121 wqannfyydf qksisfwrwg gedikifgsg vlngngqrwy nefaggeild pnnkyyrpil
181 fvtenatrsvs vegitqlnsp cwnffvrtk disfnnvfi h aystnasalp kntdgfdtlv
241 vdglvtntv vdigddclsp kpnttnvfq nlwcngthgt smgsigqypg vldienvwi
301 envtllngen garlkawagp nvggygrinnv tyknihvent dnpivldqcy fninatqcaa
361 ypsrvnftni vfeniygtss gkhgkvvadl tcsnavcsg irlknihlts pagsppvivc
421 dgiqgdigve cqsstnlttk rsiglarnlk yka

```

## C

```

1 mkfftaalfa savsafavds iipgarvipa tdtlelqhv gahhkhpnrr tvtirssrnd
61 tddvskdflw gisranhggr lllqkgkkyv igkkldlsfl nnievqldge lkftddvpyw
121 qknnfyysfq ksisfwrwg qdikifgsgv lngngqrwyn efaggeildp dntfyrpilf
181 vtenatrsvs egitqlnspc wtnffvgsnd vsfdnvyiea fstnasalpk ntdgfdsynv
241 kglsvtntv nvgddcfspk pnttdifvq lwcngthgvs mgsigqypgv mdiiehayie
301 nvtllngqng arlkawagen vgygrinnit yknirientd kpivldqcyf nvdttatcaey
361 pssvnitnit fenvygtssg kegkvvadlv cspnavcsdi hladidltsp agsppviice
421 giqgdigvec qssts

```

## D

```

1 madsrsrkqa tlgvvrdsq tlgcvcnwts dasgspird antgsinrrf fgsnsdpkea
61 pkkqttlsfs nkksksakkd sesetaqdpv pvnghtsgd anggadtvs aikskqevk
121 adepvdqnl krensseded sdvqpvskrr rktsergdeas sspkrkspk kspkkrqsqr
181 ersppaviek asgektpqke lsvsddevae eeaqsasede ekpevkkkki ekaqatlkaa
241 gnepypdwka gdpvpyaalc ttfslieomt krlvilahcs lflrqvlrlt pqdllptvql
301 minklaadya gielgigesl imkaigestg rslaviktdg heigdlglva akrsnqptm
361 fkpklptvrg vheglgiak vqghgsqdkk isgikkllsa adaataakyi vrflegklrl
421 glaektvlva laqavvahea ameghktpsa eklaegeail ktvyselpey eviipaileh
481 glsnlpkvck lppgiplkpm lakptksite vldrfegkef tceykydger aqihykdaqg
541 lsaisrnsse dlskkypdvl akldgwikeg vqsfvldcet vawdenkkv lpfqqlmtrk
601 rkdvkaedvk vkvcifafdl lflngeptvk kslrerrell hesfqvtege fqfaqyngtn
661 vldeiqtll dsvkascegl mvkmldees gyepskrsrn wlkvkkydyls gvgdslldlv
721 lgayhgrgkr tsvygaflla aynsstqtye ticnigtgfs eavleefyna lspltidrpk
781 pfyshsnvpk dqpvdvfepr lvwevktadl tlptrykaaa defmgttggg kgvslrfrpf
841 iksrddkkpe qatttravae myrkqevqk enagkkgvdd dfey

```

Figura 29: Seqüenciamento de aminoácidos de *Aspergillus fumigatus* (A); *Neosartorya fischeri* (B); *Aspergillus terreus* (C); e *Aspergillus niger* (D) mostrando os pontos de homologia com a PGPI de *Aspergillus niveus*.

#### 4.28 EFEITO DE SOLVENTES ORGÂNICOS NA ATIVIDADE DA PGPI

Para verificar o efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática, adicionou-se na mistura de reação 20% de metanol, etanol, isopropanol, butanol, acetona, benzeno, tolueno, n-hexano, formaldeído, éter etílico e dimetil-sulfóxido (DMSO), em relação ao volume de enzima presente na reação. Como ilustrado na Tabela 10, tolueno, n-hexano, benzeno e éter-etílico não provocaram queda significativa da atividade enzimática. No entanto, vários solventes provocaram queda acentuada na atividade, como formaldeído (92%), isopropanol (73%), metanol (61%) e etanol (61%).

Tabela 10: Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática da PGPI.

<b>Solvente</b>	<b>Atividade Relativa (%)</b>
Água	100 ±1
Isopropanol	27 ±1
DMSO	50 ±3
Acetona	62 ±0,3
Metanol	39 ±5
Etanol	39 ±5
Butanol	48 ±4
Formaldeído	8 ±6
Éter etílico	89 ±4
Benzeno	89 ±5
Tolueno	103 ±8
n-Hexano	108 ±15

Solventes na concentração final de 20% (V/V)

## 5 DISCUSSÃO

As proteínas são descritas como sendo os blocos que constroem as células e tecidos. Servem como reservatórios e meio de proteção para as células contra a invasão por organismos ou compostos químicos estranhos. Também funcionam como catalisadores de reações químicas entre as células e fora delas. As enzimas são especialmente interessantes na exploração industrial de fontes naturais renováveis e ainda apresentam uma vantagem sobre processos químicos, sendo mais seguras para o meio ambiente, mais específicas e fáceis de serem controladas (FAGERSTRÖM, 1995). Uma das fontes mais utilizadas pelas indústrias para a obtenção de enzimas são os microrganismos, isto ocorre em decorrência do desenvolvimento da microbiologia, que levou a elucidação dos mecanismos de produção e secreção enzimáticas, especialmente em fungos (DEMAIN, 2000).

Trabalhar com proteínas, particularmente enzimas é um segmento rapidamente crescente da indústria de biotecnologia. Microrganismos são cada vez mais empregados como agentes biotecnológicos capazes de sintetizar compostos de interesse, assim como alguns fungos filamentosos que têm demonstrado secretar grandes quantidades de proteínas no meio de crescimento (MISHRA & MAHESHWARI, 1996). Fungos estão, portanto, atraindo crescente atenção como fonte de enzimas para conversões industriais (PANDEY *et al*, 2000).

Vários estudos de otimização da produção e caracterização de pectinases têm sido realizados. Em relação à produção, variam-se alguns parâmetros, como condições de cultivo e fonte de carbono. Para a caracterização, verifica-se principalmente o efeito da temperatura, pH e íons na atividade enzimática, além da própria cinética de reação.

Neste trabalho, inicialmente foi realizado um “screening” de fungos produtores de pectinases e, neste sentido, o *Aspergillus niveus* apresentou-se como um bom produtor destas enzimas, pois teve alta produção enzimática e crescimento nos meios Adams e Czapeck. Por esse motivo, este fungo foi escolhido para dar continuidade aos experimentos. O mesmo microrganismo também apresenta alta produção de amilases, como descrito por SILVA *et al.* (2006) com meio Khanna. Com o meio Adams, ocorreu produção máxima de poligalacturonases somente no 9º dia de crescimento. No entanto, com o meio Czapeck, houve produção significativa com apenas 2 dias. Por isso, tornou-se mais viável cultivar o microrganismo neste meio, a fim de economizar tempo de cultivo, agilizando os experimentos. PATIL & DAYANAND (2006) encontraram valores parecidos para a produção de pectinases cultivando *Aspergillus niger* em meio submerso e meio sólido, onde o fungo produziu maior quantidade de enzima com 3 dias de crescimento.

No processo de otimização de cultivo, além da escolha do meio, vários outros parâmetros devem ser considerados, como densidade de inóculo, espécie e concentração da fonte de carbono e pH inicial. Em relação à densidade de inóculo, a contagem de conídios foi muito relevante, onde se pode verificar uma relação direta entre o aumento dos esporos inoculados, aumento da secreção de enzimas e aumento do crescimento, onde a melhor concentração foi de  $5 \times 10^6$  esporos/mL. Comparando-se com a literatura, verificou-se que o *Paecilomyces variotii*, para produção de amilases (MICHELIN, 2005), necessitou de uma concentração muito próxima à requerida pelo *A. niveus* para produção de pectinases.

Inicialmente para o crescimento do microrganismo, utilizou-se pectina analítica Sigma® como fonte de carbono. No entanto, o setor industrial necessitaria de substratos mais baratos e que tivessem uma boa indução para a produção de

enzimas. Para isso, testou-se várias fontes de carbono: polissacarídeos, monossacarídeos e resíduos vegetais. Nesta conjuntura, as cascas de frutas, especialmente a de laranja, gerou uma indução considerável sobre a produção de poligalacturonases, superior até mesmo à pectina Sigma. NITURE & PANT (2004) descreveram que a laranja também induziu a níveis elevados a produção de poligalacturonase II por *Fusarium moniliforme*.

Seria muito interessante a utilização de resíduos como fonte de carbono em escala industrial, uma vez que seu aproveitamento atuaria reduzindo custos e também agregaria valor a estes restos orgânicos, trazendo benefícios ao meio ambiente e ao empresário. Além disso, a concentração da fonte torna-se muito importante, uma vez que em concentrações muito baixas não seria suficiente para uma adequada indução da produção de enzimas e em concentrações muito altas, atuaria como inibidor. Neste sentido, concentrações similares tiveram a mesma indução tanto para poligalacturonase quanto para pectina liase, onde o acréscimo de grande quantidade levou a um efeito inibitório sobre a produção. No entanto, a formação de estruturas celulares do fungo aumenta em nível exponencial com a adição de quantidades crescentes de fonte de carbono.

Em meio substrato sólido, o microrganismo apresenta-se em contato direto com a fonte de carbono, o que pode gerar aumento na secreção de enzimas em relação ao meio líquido. Em meio sólido, o *A. niveus* obteve uma alta produção enzimática, superior a produção em meio líquido, mas apenas com algumas fontes (pectina Sigma, pectina Vetec, casca de limão tahiti e casca de maracujá) do total de fontes testadas. PEIXOTO (2006) suplementando o meio com variadas fontes, descreve uma produção superior de amilases em meio sólido em comparação ao meio líquido.

Uma surpreendente propriedade dos microrganismos é sua capacidade de se adaptar a ambientes extremos, como em diferentes pHs. Assim, verificou-se que pHs muito alcalinos influenciam negativamente na produção de pectina liase, no entanto pouco afeta a secreção de poligalacturonase. Além disso, o *A. niveus* apresentou excelente crescimento em todos os pHs testados. Em contrapartida, para o crescimento de *Rhizomucor pusillus*, segundo SILVA *et al.* (2005) seu crescimento ótimo ficou em torno do pH 4,0, sendo que para produção enzimática ficou em torno de pH 6,0.

Estes resultados reforçam a hipótese de aplicação industrial da poligalacturonase na fabricação de sucos e doces, uma vez que estes processos utilizam pHs ligeiramente ácidos.

Os métodos de caracterização enzimática tornam-se muito importantes para verificar sua aplicabilidade industrial. Estes processos utilizam ensaios enzimáticos como ferramenta, dentre os quais encontram-se a averiguação da temperatura ótima, estabilidade térmica, pH ótimo, estabilidade ao pH e efeito de íons. Para estes experimentos utilizou-se a poligalacturonase.

Embora o *A. niveus* seja mesófilo, a poligalacturonase secretada por ele apresenta atividade em temperaturas relativamente altas, tanto presente no extrato bruto quanto purificada. KASHYAP *et al.* (2000) em seu trabalho de revisão, descreve poligalacturonases produzidas por *Aspergillus niger* com atividade máxima em torno de 50°C. Assim como MOYO *et al.* (2003) que descreve poligalacturonases produzidas *Kluyveromyces wickerhamii* com a mesma temperatura ótima, ambos corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho. No entanto, MOHAMED *et al.* (2006) descreveu uma poligalacturonase com atividade ótima à 40°C, produzida por *Trichoderma harzianum*. Assim, estes resultados sugerem uma boa

aplicabilidade industrial desta enzima sob temperaturas relativamente altas, como na fabricação de doces, xaropes, sucos e bebidas. Quanto à termoestabilidade enzimática, a poligalacturonase bruta apresentou-se ativa por um considerável período de tempo à 60°C. No entanto, a PGPI apresentou estabilidade inferior. Ainda assim, estes resultados são bastante satisfatórios quando comparados à literatura, uma vez que MOHAMED *et al.* (2006) descreve que uma poligalacturonase produzida por *Trichoderma harzianum* foi estável por apenas 30 minutos, à 60°C.

Em relação à pectina liase secretada por *A. niveus*, a enzima apresentou temperatura ótima de 55°C, diminuindo em torno de 35% de atividade a 60°C. Em adição, a pectina liase apresentou pouca estabilidade térmica, mesmo à 40°C e na presença de diferentes compostos. Corroborando com esses dados, BUSTO *et al.* (2005) descreve uma pectina liase imobilizada com a mesma temperatura ótima, mas apresentando estabilidade maior, sendo em torno de 150 minutos a 40°C.

Um outro parâmetro utilizado para caracterização enzimática é o seu pH ótimo, no qual apresenta atividade máxima. Pequenas variações no pH podem conferir comportamentos diferentes entre as proteínas de uma mesma classe, como, por exemplo, o decréscimo de sua atividade. O pH ótimo da poligalacturonase presente no extrato bruto apresentou-se relativamente ácido, pH 4,0, com queda considerável de atividade em escalas superiores. Entretanto, a enzima purificada apresentou um faixa de pH ótimo, a qual abrange desde o pH 4,0 até o pH 6,5. MOHAMED *et al.* (2006) descreve uma poligalacturonase com atividade ótima em pH 5,0, produzida por *Trichoderma harzianum*, sendo provavelmente análoga a umas das enzimas analisadas neste trabalho, assim como a enzima descrita por MOYO *et al.* (2003), produzida por *Kluyveromyces wickerhamii*, que apresenta atividade ótima também em pH 5,0. Em relação à estabilidade ao pH, as

poligalacturonases no extrato bruto de *A. niveus* foram estáveis por 24 horas numa faixa que compreende do pH 3,0 ao pH 5,0. A PGPI mostrou estabilidade ainda maior sob as mesmas condições, apresentando, ao final de 24 horas, mais de 80% de atividade numa faixa que abrange desde o pH 4,0 até o pH 8,0, com pico no pH 6,5.

Esses resultados apresentam indícios de poligalacturonases com promissora aplicação em processos industriais ácidos e alcalinos. Corroborando com estes resultados, HOONDAL, 2002, descreve uma poligalacturonase estável numa faixa de pH que abrange do pH 3-9, produzida por *A. fumigatus*. Uma vez que as enzimas produzidas por *A. niveus* possuem uma boa estabilidade em pHs extremamente baixos, elas possuem um excelente potencial para aplicação em processos industriais ácidos. No entanto, a PGPI poderia atuar tanto em processos ácidos quanto alcalinos, uma vez que apresenta boa estabilidade nas duas condições.

Na reação enzimática, alguns íons são capazes de aumentar ou diminuir a atividade de determinadas enzimas, ou serem essenciais para o funcionamento destas, atuando como cofatores. As poligalacturonases brutas secretadas por *A. niveus* foram influenciadas positivamente por  $Mn^{++}$  e EDTA, sendo fortemente inibidas por  $Cu^{++}$  e  $Hg^{++}$ . O EDTA tem a propriedade de se complexar com vários compostos presentes no extrato bruto, que poderiam influenciar negativamente na reação enzimática. Isso explicaria o aumento da atividade com a adição deste composto. A PGPI além de ser fortemente ativada por  $Mn^{++}$ , também teve atividade aumentada na presença de  $F^-$  e  $K^+$ . Entretanto,  $Pb^{++}$  e  $Ba^{++}$ , inibiram fortemente a atividade enzimática. KAUR *et al.* (2004) verificou que a poligalacturonase de *Sporotrichum thermophile* também foi ativada por  $Mn^{++}$  e  $F^-$ . Em contrapartida, MOHAMED *et al.* (2006), pesquisando enzimas secretadas por *Trichoderma*

*harzianum*, descreve que o íon  $Mn^{++}$  inibiu totalmente a atividade da poligalacturonase II, além do  $Hg^{++}$  e  $Cu^{++}$ . A inibição por  $Hg^{++}$  pode indicar que este composto reduziu as pontes dissulfeto comprometendo a estrutura tridimensional das enzimas.

As enzimas pectinolíticas têm sido isoladas e purificadas por diversos procedimentos. Geralmente, suas purificações são um tanto difíceis, necessitando de várias etapas, como clarificação, precipitação, cromatografias de troca-iônica e gel filtração. No entanto, a purificação da PGPI produzida por *A. niveus* foi realizada com apenas dois passos, uma coluna de troca-iônica DEAE celulose e outra de gel filtração Biogel P100, cuja separação se dá entre proteínas globulares de 10 – 100kDa. Esse processo resultou na obtenção de duas formas pectinolíticas, a PGPI e a PGPII. MOHAMED *et al.* (2006) utilizou um procedimento semelhante para purificar duas poligalacturonases produzidas por *Trichoderma harzianum*, uma coluna de troca-iônica DEAE-Sepharose CL-6B e uma gel filtração Sephacryl S-200. No entanto, ESQUIVEL & VOGET (2004) tiveram que submeter seu extrato a uma clarificação, precipitação com acetona para depois aplicar em uma coluna de troca-iônica Sepharose Q e gel filtração Sephacryl S-100 para purificar uma poligalacturonase de *Aspergillus kawachii*.

Os fatores de recuperação e de purificação apresentados pela PGPI foram relativamente baixos ao final do processo de purificação, após a eluição em Biogel P100, onde pode ter ocorrido desnaturação da enzima durante o processo de liofilização que precede este passo cromatográfico. Este resultado ainda é animador se comparado com outras poligalacturonases purificadas, como, por exemplo, a PGI de *Trichoderma harzianum* (MOHAMED *et al.*, 2006), que apresentou fator de recuperação de 3,2% e fator de purificação de 0,06 vezes.

Para se certificar da pureza das enzimas submeteram-se as mesmas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE). Neste gel, a PGPI apresentou uma única banda, comprovando sua pureza. No entanto, a PGPII apresentou duas bandas, indicando um contaminante ainda presente no extrato. Além disso, o mesmo procedimento foi utilizado a fim de certificar a massa molecular da PGPI, juntamente com eluição em coluna Bio-Sil-Sec-400 em FPLC. Nestes experimentos, a massa molecular encontrada foi em torno de 123kDa e 102,6kDa, para SDS-PAGE e FPLC, respectivamente, onde existe um desvio padrão de 10%. A massa encontrada por ESQUIVEL & VOGET (2004) para PGI, utilizando SDS-PAGE, foi muito menor, em torno de 60kDa para PGI. Em adição, BLANCO *et al.* (1999) em seu trabalho de revisão apresenta pectinases com massas moleculares que variam de 21,9 a 53kDa.

Uma cromatografia de produto de hidrólise pode oferecer informações importantes para se classificar uma enzima, baseado em seu modo de ação sobre o substrato. Os resultados obtidos neste tipo de experimento podem relacionar uma enzima como endo ou exohidrolase. O cromatograma gerado pela PGPI apresentou apenas a liberação de ácido monogalacturônico da reação enzimática, certamente porque a enzima atua nas extremidades da cadeia do polipectato de sódio liberando estes monossacarídeos. Portanto, pode-se classificar esta enzima como uma exopoligalacturonase. *Aspergillus niger* pode produzir tanto endo como exopectinases (PATIL & DAYANAND, 2006). Além disso, KLUSKENS *et al.* (2005) mostrou uma exopoligalacturonase produzida por *Thermotoga marítima*. Entretanto, ESQUIVEL & VOGET (2004) e GADRE *et al.* (2003) mostraram endopoligalacturonases produzidas por *Aspergillus kawachii* e *Mucor flavus*, respectivamente. Tais dados mostram uma variedade de mecanismos de ação de

poligalacturonases produzidas por diferentes microrganismos, tanto endo como exohidrolases.

A determinação dos parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ , frente ao substrato polipectato de sódio SIGMA<sup>®</sup>, foi realizada com o auxílio do programa computacional Enzyplot<sup>®</sup>. Esses parâmetros foram determinados segundo o método de Michaelis-Menten (1913) e Hanes (1932). Como representação gráfica foi escolhido o modelo proposto por Hanes. Os valores cinéticos obtidos utilizando a PGPI foram de 6,73mg/mL para o  $K_m$  e 230U/mg para a  $V_{m\acute{a}x}$ , onde o gráfico de Michaelis-Menten mostrou que a atividade enzimática sofre inibição em altas concentrações de substrato. MOHAMED *et al.* (2006) obteve resultados de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  menores, 3,4mg/mL e 1,28U/mg, respectivamente, para PGII produzida por *Trichoderma harzianum*. POLIZELI *et al.* (1991) obteve valores próximos de  $K_m$ , 5,0mg/mL, para uma PG de *Neurospora crassa*. KLUSKENS *et al.* (2005) apresentou  $K_m$  de 0,06mg/mL e  $V_{m\acute{a}x}$  de 1170U/mg para uma exopoligalacturonase da bactéria *Thermotoga maritima*. Diferenças de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram relatados no trabalho de revisão de GUMMADI E PANDA (2003). Portanto, ocorre uma alta flexibilidade de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  gerados por poligalacturonases, não havendo valores padrões característicos para esta classe de enzimas.

A poligalacturonase extracelular purificada, PGPI, foi identificada como uma glicoproteína que contém aproximadamente 37% de carboidratos. NITURE & PANT (2004), purificaram duas poligalacturonases de *Fusarium miniliforme*, sendo que o conteúdo de carboidrato da forma PGI foi de 4% e da PGII de 8,6%. Entretanto, CHELLEGATTI *et al.* (2002) encontrou valores bem maiores, 81% de carboidrato em uma exopoligalacturonase purificada produzida por *Penicillium frequentans*.

Em relação ao ponto isoelétrico (pI) da PGPI de *A. niveus*, este ficou em torno de 5,4. Geralmente encontra-se poligalacturonases na literatura com valores de PI maiores do que este. Como exemplo pode-se citar a poligalacturonase II de *Fusarium miliniforme* (NITURE & PANT, 2004), que possui um ponto isoelétrico de 8,6 ou a endopoligalacturonase de *Mucor flavus* (GADRE *et al.*, 2003) com PI de 8,3. No entanto, vale ressaltar as diferenças entre estas enzimas e deste trabalho. A característica mais marcante é a diferença de massa molecular, onde a enzima de NITURE & PANT (2004) e de GADRE *et al.* (2003) apresentam 30,6 e 38,7kDa, respectivamente, contra os 102,6kDa da PGPI de *A. niveus*. Essa relação indica que a proposição expressa por WONG *et al.* (1988), peso molecular baixo/PI alto, para xilanases também pode ser aplicada a algumas pectinases.

O seqüenciamento da PGPI de *A. niveus* mostrou certo grau de homologia com poligalacturonases de outros microrganismos, como uma exopoligalacturonase de *Aspergillus fumigatus* e *Neosartorya fischeri*, com 80% de identidade em ambos. O *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* apresentaram uma proteína hipotética também com 100% e 80% de identidade, respectivamente. Não foi encontrada na literatura uma árvore filogenética de poligalacturonases, no entanto, ao se tratar do gênero *Aspergillus*, espera-se que esses fungos se encontrassem próximos ao *A. niveus*. Essa hipótese pôde ser reforçada devido ao alto grau de homologia obtido entre as proteínas dos fungos.

Solventes orgânicos podem afetar a estabilidade e atividade enzimática. No entanto, enzimas que mantêm alta estabilidade e atividade na presença desses compostos poderiam ser mais facilmente aplicadas em processos tecnológicos que utilizam solventes, como a extração de produtos naturais de vegetais. A PGPI foi estável na presença de tolueno, n-hexano, benzeno e éter-etílico, mas sofreu queda

de 92, 73, 61 e 61% atividade com a adição de formaldeído, isopropanol, metanol e etanol, respectivamente. Nenhum relato na literatura foi encontrado em relação a esses efeitos em poligalacturonases. No entanto, uma amilase de *Brachybacterium sp.* (DOUKYU *et al.*, 2007) também foi relativamente estável ao tolueno e benzeno, sofrendo queda de atividade com a adição de etanol, propanol e acetona.

Analisando os dados obtidos nos experimentos pode-se concluir que o trabalho apresentado possui relevância científica, uma vez que não foram encontrados trabalhos na literatura com pectinases produzidas e purificadas de *Aspergillus niveus*. Este microrganismo apresentou-se como bom produtor de enzimas pectinolíticas, especialmente as poligalacturonases, em cultura líquida e em substrato sólido utilizando, como fonte de carbono resíduos industriais, que são encontrados a baixo custo e em grande escala. A poligalacturonase purificada PGPI apresentou atividade ótima em uma considerável faixa de pH e excelente estabilidade em uma ampla faixa de pH. Portanto, estes resultados sugerem que a PGPI de *A. niveus* teria uma boa performance em processos industriais.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, P.R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopathol.** v. 112, p.35-37, 1990.
- ALMEIDA, M.S.; KURTENBACH, E. Como purificar proteínas?. **Biociência e Desenvolvimento**, nº 24, p.30-35, 2002.
- AYERS, W. A.; PAPAVIDAS, G. C.; DIEM, A. F. Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*. **Phytopathol.**, v.56, p.1006-1011, 1966.
- BERBEE, M.L.; TAYLOR, J.W. Dating the evolutionary radiations of the true fungi **Can. J. Bot.** v.71, p.1114-1127, 1993.
- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.** v.18(5), p.355-383, 2000.
- BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T.G. Production of pectic enzymes in yeasts. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 175, p. 1-9, 1999.
- BLUM, H.; BEIER, H.; CROSS, H.J. Improvised silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** v. 81, p. 93-99, 1987.
- BUSTO, M.D.; GARCÍA-TRAMONTÍN, K.E.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M. Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. **Bioresource Technol.**, v.97, p. 1477–1483, 2006.
- CASSELTON, L.; ZOLAN, M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. **Nature Rev. Genet.** v.3, n.9 p.683-697, 2002.
- CHELLEGATTI, M.A.S.C.; FONSECA, M.J.V.; SAID, S. Purification and partial characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium frequentans*. **Microbiol. Res.** v. 157, p. 19–24, 2002.

- CROTTI, L.B.; JORGE, J.A.; TEREZI, H.F.; **POLIZELI, M.L.T.M.** Characterization of galactose-induced extracellular and intracellular pectolytic activities from the *exo-1* mutant strain of *Neurospora crassa*. **J. Ind. Microbiol. & Biotechnol.**, v.20: p.238-243, 1998a.
- CROTTI, L.B.; JORGE, J.A.; TEREZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and characterisation of galactose-induced pectinases from the *exo-1* mutant strain of *Neurospora crassa*. In: Pectins and Pectinases, **J. Visser and A. G. J. Voragen** (Editors). Elsevier Science B. V., p. 787-792, 1996.
- CROTTI, L.B.; JORGE, J.A.; TEREZI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Regulation of the pectic enzymes from the *exo-1* mutant strain of *Neurospora crassa*: effects of glucose, galactose and galacturonic acid. **J. Basic Microbiol.**, v.38, p.181-188, 1998b.
- DEMAIN, A.L. Microbial biotechnology. **Trends Biotechnol.** v. 18, p.26-31, 2000.
- DOUKYU, N.; YAMAGISHI, W.; KUWAHARA, H.; OGINO, H.; FURUKI, N. Purification and characterization of a maltooligosaccharide-forming amylase that improves product selectivity in water-miscible organic solvents, from dimethylsulfoxide tolerant *Brachybacterium sp.* strain LB25. **Extremophiles**, v.6, p.781-788, 2007.
- DUBINGH, D.N. Protein engineering from a bioindustrial point of view. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 8, p. 417-422, 1997.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** v.28, p. 350-356.

- ESQUIVEL, J.C.C.; VOGET, C.E. Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. **J. Biotechnol.**, v.110, p. 21–28, 2004.
- FAGERSTRÖM, R.; Studies on the debranching activity of fungal glucoamylases. **Primalco Ltd.** Biotec R & D, Helsinki and Department of Biochemistry, University of Helsinki. Academic Dissertation, p. 83, 1995.
- FUJINO T, ITOH T. Changes in pectin structure during epidermal cell elongation in Pea (*Pisum sativum*) and its implications for cell wall architecture. **Plant Cell Physiol.** v.39, p. 1315-1323, 1998.
- GADRE, R.V.; DRIESSCHE, G.V.; BEEUMEN, J.V.; BHAT, M.K. Purification, characterisation and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 32 p. 321–330, 2003.
- GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quim. Nova**, v. 30, no. 1, p.136-145, 2007
- GUMMADI, S. N.; KUMAR, D. S. Microbial pectic transeliminases. **Biotechnol. Lett.**, v.27, p. 451– 458, 2005.
- GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purication and biochemical properties of microbial pectinases – a review. **Process Biochem.** v.38, p. 987-996, 2003.
- HANES, C.S. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. **Biochem. J.**, v.26, p.1406-1421, 1932.
- HE, S. Y.; COLLMER. A. Molecular cloning, nucleotide sequence, and marker exchange mutagenesis of the exo-poly-alpha-D-galacturonosidase-encoding *pehX* gene of *Erwinia chrysanthemi* EC16. **J. Bacteriol.** v.172, p.4988-4995, 1990.

- HECKMAN, M.J. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. **Science** v.293, p.1129-1133, 2001.
- HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, p. 409–418, 2002.
- 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. **Biociencia**, v. 13, p. 24-26, 2000.
- JAYANI, R.S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochem.** v.40, p.2931–2944, 2005.
- KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Appl. Sci.** London, p.217-225, 2000.
- KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYANARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Bioresource Technol.** v.94, p.239–243, 2004.
- KHANNA, P., SUNDARI, S.S, KUMAR, N.J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.11, p.242-243, 1995.
- KLUSKENS, L.D.; ALEBEEK, G.J.W.M.; WALTHER, J.; VORAGEN, A.G.J.; VOS, W.M.; OOST, J. Characterization and mode of action of an exopolygalacturonase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. **FEBS Journal**, v.272, p.5464–5473, 2005.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEONE, F.A.; BARANAUSKAS, J.A.; CIANCAGLINI, P. Enzyplot: A microcomputer assistant program for teaching enzyme kinetics. **Biochem. Educ.** v.23(1), p.35-37, 1995.
- LINEAWAVER, H.; BURK, D. The determination of the enzymes dissociation. **J. Am. Chem. Soc.**, v.56, p. 658-666, 1934.
- LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A. L., RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.267-275, 1951.
- MARQUES M.R.; BUCKERIDGE M.S.; BRAGA M.R.; DIETRICH S.M. Characterization of an extracellular endopolygalacturonase from the saprobe *Mucor ramosissimus* Samutsevitsch and its action as trigger of defensive response in tropical plants. **Mycopathol.**, v.162(5), p.337-46, 2006.
- MARTINS, E.S. Purificação de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido e caracterização bioquímica das mesmas. **Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de doutor em ciências biológicas**, p. 132, 2006.
- MICHAELIS, L.; MENTEN, M.L. Die kinetik der invertinwirkung. **Biochemische Zeitschrift**, v.49, 334-336, 1913.
- MICHELIN, M. Estudo da glucoamilase e da  $\alpha$ -amilase produzidas pelo fungo *Paecilomyces variotii*: purificação, caracterização bioquímica e relações

filogenéticas. **Monografia apresentada à FFCLRP-USP para obtenção do título de bacharel em ciências biológicas**, p.143, 2005.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** v.31, p 426 – 429, 1959.

MISHRA, R.S.; MAHESHWARI, R. Amylases of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*: Their purification, properties, action on starch and response to heat. **J. Biosci.** v. 21(5), p. 653-672, 1996.

MOHAMED, S.A; FARID, N.M.; HOSSINY, E.N.; BASSUINY, R.I. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. **J. Biotechnol.**, v.127(1), p.54-64, 2006.

MOYO, S.; GASHE B.A.; COLLISON E.K.; MPUCHANE S. Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. **International J. Food Microbiol.**, v. 85, p. 87–100, 2003.

NAGEL, C. W.; ANDERSSON, M. M. Action of a bacterial transeliminase on normal and unsaturated oligogalacturonic acids. **Arch. Biochem. Biophys.** v.112, p.322-330.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger princípios de Bioquímica. **Ed. Sarvier**, 3<sup>o</sup>ed., São Paulo, p.100-103, 2002.

NITURE, S.K.; PANT, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. **Microbiol. Res.** v.159(3), p. 305-3014, 2004.

- O'FARREL, P.Z.; GOODMAN, H.M. & O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well acidic proteins. **Cell** v.12, p. 1133-1142, 1983.
- PANDEY, A.; NIGAN, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D; MOHAN, R. Advances in microbial amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 31, p. 135-152, 2000.
- PATIL, S.R.; DAYANAND, A. Production of pectinase from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. **Bioresour. Technol.** v. 97, p. 2054–2058, 2006.
- PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; SANDRIM, V.C.; GUIMARÃES, L.H.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; POLIZELI, M.L. Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source. **Bioprocess Biosyst Eng.**, DOI 10.1007/s00449-007-0166-4, 2007.
- PERALTA, D.; TERENCEZI, H.F.; JORGE, J.A.  $\beta$ -D-Glycosidase activities of *Humicola grisea*: Biochemical and kinetics characterization of a multifunctional enzyme. **Biochem. Biophys.** v. 1033, p. 243-249, 1990.
- PESSOA, A.; KILIKIAN, B.V.; Purificação de produtos biotecnológicos. 1º ed., **Ed. Manole LTDA**, Barueri/SP, p. 456, 2005.
- PICKERSGILL, R.; SMITH, D.; WORBOYS, K.; JENKINS, J. Crystal Structure of Polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. **J. Biol. Chem.**, v.273(38), p.24660–24664, 1998.
- PITT, M., Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. In: **Methods Enzymol.** v.161, p. 350-354, 1988.

- POLIZELI, M.L.T.M.; JORGE, J.A.; TEREZI, H.F. Effect of the carbon source on the  $\beta$ -glucosidase system of the thermophilic fungus *Humicola grisea*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.12, p. 297-299, 1996.
- POLIZELI, M.L.T.M.; JORGE, J.A.; TEREZI, H.F. Pectinase production by *Neurospora crassa*. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase activity. **J. Gen. Microbiol.**, v.137, p. 1815-1823, 1991.
- POLIZELI, M.L.T.M.; PIETRO, R.C.L.R.; JORGE, J.A., TEREZI, H.F. Effects of cell wall deficiency on the synthesis of polysaccharide-degrading exoenzymes; a study on mycelial and wall-less phenotypes of the *fz; sg; os-1* ("slime") triple mutant of *Neurospora crassa*. **J. Gen. Microbiol.**, v.136, p. 1463-1468, 1990.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. Os Reinos dos Fungos Vol. 2. **Ed. da Universidade de Santa Cruz do Sul**. Santa Cruz do Sul, RS, 2002.
- RIDLEY, B.L.; O'NEIL, M.A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signalling. **Phytochemistry** v.57, p.929-967, 2001.
- RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J. A.; TEREZI, H.F.; RECHIA, C.G.V., POLIZELI, M.L.T.M. Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, vol.26, p.156-160, 2001.
- SANTOS, A.S.R. Biodiversidade, bioprospecção, conhecimento tradicional e o futuro da vida, 2001. Disponível em: <http://www.ccuec.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html>. Acesso em: 08/11/2007.

- SCHMOHL N.; PILLING J.; FISAHN J.; HORST W.J. Pectin methylesterase modulates aluminum sensitivity in *Zea mays* and *Solanum tuberosum*. **Physiol. Plantarum** 109: 419-427, 2000.
- SHEVCHIK, V. E.; KESTER, H. C. M.; BENEN, J. A. E.; VISSER, J.; ROBERT-BAUDOY, J.; HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. (1999). Characterization of the exopolygalacturonase lyase PelX of *Erwinia chrysanthemi* 3937. **J. Bacteriol.** 181, 1652-1663.
- SILVA, T. M.; GUIMARÃES, L.H.; JORGE, J.A.; TERENCEI, H.F.; POLIZELI, M.L.T.M. Amylase production in submerged fermentation by the filamentous fungus *Aspergillus niveus*. **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, p.80, 2006.
- SILVA, T. M.; ATTILI-ANGELIS, D.; CARVALHO, A. F. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production of sacharogenic and dextrinogenic amylases by *Rhizomucor pusillus* A 13.36. **J. Microbiol. (Korea)**. v. 43, n. 6, p. 561-568, 2005.
- PICKERSGILL, R.; SMITH, D.; WORBOYS, K.; JENKINS, J. Crystal structure of Polygalacturonase from *Erwinia carotovora*, *J. Biol. Chem.*, v. 273, n. 38, p. 24660-24664, 1998.
- SOUZA-MOTTA, C.M.; CAVALCANTI, M.A.Q.; PORTO, A.L.F; MOREIRA, K.A.; LIMA FILHO, J.L. *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: new source for inulinase production. **Braz. Arch. Biol. Technol.** vol.48 no.3, 2005.
- VILLA, B. S. Production of pectic enzymes in yeasts, *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 175, p. 1-9, 1999.
- VOGEL, H. F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. **Am Nat**, v. 98, p. 435-446, 1964.

- VRIES, R.P.; *et all.* Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. **FEBS Letters**, v. 530, p. 41-47, 2002.
- WILLATS, W.G.T.; McCARTNEY, L.; MACKIE, W.; KNOX, J.P. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, v. 47, p. 9–27, 2001.
- WILLATS, W.G.T.; KNOX, J.P.; MIKKELSEN, J.D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends Food Science & Technol.**, v. 17, p. 97–104, 2006.
- WHITAKER, J. R. Microbial pectolytic enzymes. In: Microbial Enzymes and Biotechnology (eds. Fogarty, W. M. and Kelly, C. T.) **Appl. Science**, London e New York. p. 133-175, 1991.
- WISEMAN, A. Handbook of Enzyme Biotechnology. Ltd **John Wiley & Sons**, editors. p.148, 1975.
- WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J.N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiol. Rev.**, v. 52, p. 305-317, 1988.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)