

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

**Investigação do sistema pectinolítico
produzido pelo fungo *Paecilomyces
variotii*: produção, purificação e
caracterização bioquímica de uma
poligalacturonase**

ANDRÉ RICARDO DE LIMA DAMÁSIO

Orientadora: Prof. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

**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**

Ribeirão Preto/SP

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e a minha irmã, como forma de retribuição pela confiança em mim depositada, pois, além da vida eles me deram sempre coragem para luta, alento para os estudos e esperança para o futuro. Eles estão sempre ao meu lado, apoiando-me, sacrificando-se para que eu sempre possa continuar com os meus ideais.

Pai, mãe, Adri, nem todas as palavras do mundo conseguem expressar tudo o que eu sinto por vocês. Adoro vocês. Dividam comigo o mérito deste trabalho, pois ele também vos pertence.

AGRADECIMENTOS

Grande é minha lista de agradecimentos, o que me torna uma pessoa de sorte.

A Deus pela força, coragem e luz destinadas a mim e por ter colocado em meu caminho as pessoas certas.

Aos meu pais, Saulo Militão Damásio e Maria Sueli de Lima Damásio, pela confiança, motivação e carinho.

A minha irmã, Adriana, para mim um grande exemplo de determinação.

A minha namorada e minha grande companheira Any Elisa de Sousa Schmidt Gonçalves pela compreensão e por estar ao meu lado. A sua família que eu tanto quero bem.

A Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli, pela oportunidade, apoio, e principalmente pela amizade e “puxões de orelha” que sempre me fizeram seguir o caminho certo.

Aos Professores Dr. João Atílio Jorge, Dr. Héctor Francisco Terenzi e Dr. Luis Henrique, pela ajuda, colaboração e sugestões valiosas.

As Professoras e amigas, Clarice Osaku e Marina Kimiko Kadowaki pelos ensinamentos que ficarão para toda vida.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

À Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, local onde foi desenvolvida esta pesquisa.

Aos meu amigos e irmãos de República, Tony Márcio (Beraba), Willianzinho, Alex e Guzão, vocês foram incríveis.

Novamente aos meus grandes amigos Willian e Maller pelos bons momentos que já passamos e com certeza, ainda construiremos muitas histórias para contar. Vocês estarão em todos os meus agradecimentos.

Aos amigos Fausto, Nilmar, Lobão e André, pela amizade sincera e para todas as horas.

Aos amigos do Laboratório: Simonão, Michelin, Vivi, Vitão, Allan, Ana Cláudia, Ju, Cíntia, Tati, Marita, Vanessa, Pri, Jorge, Fabrício, Aninha, Vanessa, Alana e Tida pela convivência agradável, muitos momentos de descontração e colaborações.

Agradecimentos especiais a Simonão e Michelin pela grande ajuda, suprimindo minhas dúvidas a todo momento.

As amigas Vivian e Ernna, quantas histórias.

Ao meus queridos amigos, Jão e Juliano, pelos vários momentos de descontração e disponibilidade.

A todos os agregados da República.

Aos técnicos Maurício e Ricardo (Fessor) pela colaboração e disponibilidade. Fessor um exemplo de pessoa prestativa, um verdadeiro amigo.

Ao “tio” do bandeirão, pelas canecas emprestadas.

A querida Ivone, por suportar nossas dúvidas e vários telefonemas.

Aos demais professores que com sua dedicação me ajudaram em minha formação e a abrir novos horizontes. Sempre que precisei me estenderam uma mão amiga.

A todos vocês que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho os meus mais sinceros AGRADECIMENTOS.

PACIÊNCIA

Ah! Se vendessem paciência nas farmácias e supermercados... Muita gente iria gastar boa parte do salário nessa mercadoria tão rara hoje em dia.

Por muito pouco a madame que parece uma "lady" solta palavrões e berros que lembram as antigas "trabalhadoras do cais"... E o bem comportado executivo?

O "cavalheiro" se transforma numa "besta selvagem" no trânsito que ele mesmo ajuda a tumultuar...

Os filhos atrapalham, os idosos incomodam, a voz da vizinha é um tormento, o jeito do chefe é demais para sua cabeça, a esposa virou uma chata, o marido uma "mala sem alça". Aquela velha amiga uma "alça sem mala", o emprego uma tortura, a escola uma chatice.

O cinema se arrasta, o teatro nem pensar, até o passeio virou novela.

Outro dia, vi um jovem reclamando que o banco dele pela internet estava demorando a dar o saldo, eu me lembrei da fila dos bancos e balancei a cabeça, inconformado...

Vi uma moça abrindo um e-mail com um texto maravilhoso e ela deletou sem sequer ler o título, dizendo que era longo demais.

Pobres de nós, meninos e meninas sem paciência, sem tempo para a vida, sem tempo para Deus.

A paciência está em falta no mercado, e pelo jeito, a paciência sintética dos calmantes está cada vez mais em alta.

Pergunte para alguém, que você saiba que é "ansioso demais" onde ele quer chegar?

Qual é a finalidade de sua vida?

Surpreenda-se com a falta de metas, com o vago de sua resposta.

E você?

Onde você quer chegar?

Está correndo tanto para quê?

Por quem?

Seu coração vai agüentar?

Se você morrer hoje de infarto agudo do miocárdio o mundo vai parar?

A empresa que você trabalha vai acabar?

As pessoas que você ama vão parar?

Será que você conseguiu ler até aqui?

Respire... Acalme-se...

O mundo está apenas na sua primeira volta e, com certeza, no final do dia

vai completar o seu giro ao redor do sol, com ou sem a sua paciência...

**NÃO SOMOS SERES HUMANOS PASSANDO POR UMA
EXPERIÊNCIA ESPIRITUAL...**

**SOMOS SERES ESPIRITUAIS PASSANDO POR UMA
EXPERIÊNCIA HUMANA...**

Arnaldo Jabor

ÍNDICE GERAL

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	iii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	v
Resumo	vi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Substâncias pécticas	2
1.2 Sistema pectolítico	5
1.3 Ocorrência de enzimas pécticas em leveduras e fungos	10
1.4 Aplicações de pectinases no setor comercial	13
1.4.1 Pectinases ácidas	14
1.4.1.1 Extração e clarificação de sucos de fruta e vegetais	14
1.4.1.1.1 Maçã	15
1.4.1.1.2 Produção de vinho	16
1.4.1.1.3 Laranja	16
1.4.1.1.4 Limão	17
1.4.1.1.5 Ração animal	18
1.4.2 Pectinases alcalinas	18
1.4.2.1 Extração de óleo de oliva	18
1.4.2.2 Fermentação de chá e café	18
1.4.2.3 Indústria têxtil	19
1.4.2.4 Indústria de papel e celulose	20
1.5 Fungos filamentosos para produção de enzimas	20
1.5.1 <i>Paecilomyces variotii</i>	21
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Coleta e isolamento dos fungos	24
3.2 Pré-seleção de microrganismos pectinolíticos em fermentação líquida	25
3.3 Manutenção das cepas em laboratório	25
3.4 Meios para a manutenção das cepas	26
3.5 Obtenção dos conídios	26

3.6 Obtenção das culturas em meio líquido.....	27
3.7 Obtenção de enzimas extracelulares e extração das enzimas intracelulares	30
3.8 Diálise das amostras.....	31
3.9 Dosagens enzimáticas.....	31
3.9.1 Dosagem da atividade de poligalacturonase, amilase, xilanase e invertase .	31
3.9.2 Dosagem da Pectato Liase	32
3.9.3 Dosagem da Pectina Liase	32
3.9.4 Dosagem de Manganês Peroxidase (MnP) – atividade em UV	33
3.9.5 Dosagem de Lignina Peroxidase (LiP) – atividade em UV	33
3.9.6 Lacase	34
3.10 Determinação de proteínas e outros métodos analíticos	34
3.11 Condições de cultivo em meio substrato sólido	35
3.12 Obtenção do extrato bruto a partir de cultivo em substrato sólido	35
3.13 Purificação das poligalacturonases extracelulares em colunas cromatográficas	35
3.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE).....	36
3.14.1 Detecção de proteínas através do método de coloração por nitrato de prata.....	37
3.14.1.1 Solução de pré-tratamento.....	38
3.14.1.2 Solução de impregnação	38
3.14.1.3 Solução de revelação	38
3.14.1.4 Solução inibitória da revelação	38
3.15 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	39
3.16 Determinação da massa molecular por cromatografia de filtração em gel ...	39
3.17 Cromatografia em camada delgada de sílica do produto de hidrólise (TLC).....	40
3.18 Determinação da natureza glicoprotéica	41
3.19 Focalização isoeétrica.....	41
3.20 Análise cinética: Km e Vmáx	42
3.21 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da poligalacturonase.....	42

3.22 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da poligalacturonase em ausência de substrato.....	42
3.23 Efeito do pH sobre a atividade da poligalacturonase.....	43
3.24 Efeito do pH sobre a estabilidade da poligalacturonase em ausência de substrato	43
3.25 Efeito de íons sobre a atividade enzimática.....	43
3.26 Imunoensaio contra poligalacturonase	44
3.26.1 Imunização.....	44
3.26.2 Teste ELISA (Enzyme-linked immusorbent assay).....	45
3.26.3 Western blotting da poligalacturonase purificada de <i>Paecilomyces variotii</i>	46
3.27 Repetibilidade dos experimentos	47
4 RESULTADOS	48
4.1 Seleção das linhagens produtoras de pectinases em fermentação líquida	48
4.2 Tempo de reação enzimática.....	49
4.3 Avaliação de meios de cultivo para produção de poligalacturonase.....	51
4.4 Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de poligalacturonase	52
4.5 Efeito da temperatura e pH na reação enzimática	54
4.6 Estabilidade à temperatura e ao pH da poligalacturonase extracelular	55
4.7 Efeito do pH inicial de meio de cultivo sobre a produção de poligalacturonase.....	56
4.8 Efeito da temperatura de cultivo sobre a produção de poligalacturonase..	57
4.9 Avaliação de diferentes fontes de carbono sobre a produção de poligalacturonase.....	59
4.10 Efeito da concentração da fonte de carbono na produção de poligalacturonase.....	60
4.11 Efeito da adição de glicose no meio de cultivo sobre a produção de poligalacturonase.....	62
4.12 Efeito da concentração osmótica na produção e atividade de poligalacturonase.....	63
4.13 Teste de aplicabilidade do extrato bruto em fibras alimentares	64
4.14 Efeito da adição de ácido monogalacturônico no meio de cultivo sobre a produção de poligalacturonase.....	65

4.15	Produção de pectinases em meio substrato sólido.....	67
4.16	Purificação da poligalacturonase extracelular em colunas cromatográficas	68
4.16.1	Purificação da poligalacturonase	69
4.17	Critério de pureza	72
4.18	Determinação da massa molecular.....	72
4.19	Determinação da massa molecular por cromatografia de filtração em gel ...	75
4.20	Cromatografia em camada delgada de sílica do produto de hidrólise da enzima purificada.....	77
4.21	Determinação do conteúdo de carboidratos	77
4.22	Determinação do ponto isoelétrico.....	77
4.23	Hidrólise de diferentes substratos pela poligalacturonase purificada.....	79
4.24	Análises cinéticas da poligalacturonase	80
4.25	Efeito do pH sobre a hidrólise do substrato pela poligalacturonase.....	81
4.26	Efeito do pH sobre a estabilidade da poligalacturonase em ausência de substrato	82
4.27	Efeito da temperatura sobre a hidrólise do substrato pela poligalacturonase.....	83
4.28	Efeito da temperatura sobre a estabilidade da poligalacturonase em ausência de substrato.....	84
4.29	Efeito da adição de íons, EDTA e β -mercaptoetanol à mistura de reação, sobre a atividade da poligalacturonase.....	85
4.30	Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática.....	87
4.31	Efeito de diferentes concentrações de NaCl na atividade enzimática.....	88
4.32	Produção de anticorpos policlonais anti-poligalacturonase extracelular ..	88
4.33	Western blotting	89
5	DISCUSSÃO	91
6	CONCLUSÕES.....	110
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
	SUMMARY	126

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura básica da pectina	6
Figura 2: Modo de ação das pectinases em uma molécula de pectina	9
Figura 3: Padronização do tempo de hidrólise do substrato pelo extrato bruto.....	50
Figura 4: Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de poligalacturonase por <i>Paecilomyces variotii</i>	53
Figura 5: Determinação da temperatura e pH ótimos de reação.....	54
Figura 6: Estabilidade ao pH e inativação térmica	56
Figura 7: Perfil cromatográfico em DEAE-Fractogel da atividade poligalacturonásica produzida por <i>Paecilomyces variotii</i>	70
Figura 8: Perfil cromatográfico em Sephadex G-100 da atividade poligalacturonásica produzida por <i>Paecilomyces variotii</i>	71
Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE 12%) da poligalacturonase	73
Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE 8%) da poligalacturonase	74
Figura 11: Determinação da massa molecular (MM) da poligalacturonase de <i>Paecilomyces variotii</i> por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE 8%)	75
Figura 12: Determinação da massa molecular da poligalacturonase extracelular de <i>Paecilomyces variotii</i> em HPLC.....	76
Figura 13: Cromatografia em camada delgada de sílica do produto de hidrólise da ação da poligalacturonase.....	78

Figura 14: Representação gráfica da focalização isoeétrica da poligalacturonase produzida por <i>Paecilomyces variotii</i>	79
Figura 15: Representação gráfica de Hanes para determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para hidrólise de polipectato de sódio pela poligalacturonase.....	81
Figura 16: Influência do pH na atividade poligalacturonásica produzida por <i>Paecilomyces variotii</i>	82
Figura 17: Estabilidade ao pH da atividade poligalacturonásica	83
Figura 18: Influência da temperatura na atividade da poligalacturonase produzida por <i>Paecilomyces variotii</i>	84
Figura 19: Termoinativação da atividade poligalacturonásica a 45°C, 50°C e 55°C	85
Figura 20: Western Blotting realizado com o anticorpo anti-PG de <i>Paecilomyces variotii</i>	90

Lista de Tabelas

Tabela 1: Seleção das linhagens produtoras de pectinases em fermentação líquida	49
Tabela 2: Avaliação de meios de cultivo para produção de poligalacturonase	52
Tabela 3: Efeito do pH do meio de cultivo para produção de poligalacturonase por <i>Paecilomyces variotii</i>	57
Tabela 4: Efeito da temperatura de cultivo na produção de poligalacturonase por <i>Paecilomyces variotii</i>	58
Tabela 5: Efeito da fonte de carbono na produção de poligalacturonase por <i>Paecilomyces variotii</i>	61
Tabela 6: Efeito da concentração da fonte de carbono (pectina Sigma) na produção de poligalacturonase por <i>Paecilomyces variotii</i>	62
Tabela 7: Efeito da adição de glicose no meio de cultivo sobre a produção de poligalacturonase por <i>Paecilomyces variotii</i>	63
Tabela 8: Efeito da concentração osmótica na produção e atividade de poligalacturonase por <i>Paecilomyces variotii</i>	64
Tabela 9: Teste de aplicabilidade do extrato bruto em fibras alimentares	65
Tabela 10: Enzimas induzidas e exportadas para o extrato bruto	66
Tabela 11: Efeito da adição de ácido monogalacturônico no meio de cultivo sobre a produção de poligalacturonase por <i>Paecilomyces variotii</i>	66
Tabela 12: Produção de poligalacturonase em meio substrato sólido	68
Tabela 13: Etapas de purificação da poligalacturonase extracelular produzida pelo fungo <i>Paecilomyces variotii</i>	72

Tabela 14: Especificidade ao substrato da poligalacturonase purificada de <i>Paecilomyces variotii</i>	80
Tabela 15: Constantes cinéticas aparentes da poligalacturonase.....	81
Tabela 16: Efeito de diferentes íons sobre atividade enzimática.....	86
Tabela 17: Efeito de solventes orgânicos na atividade poligalacturonásica.....	87
Tabela 18: Efeito da concentração de NaCl na atividade poligalacturonásica	88

Lista de Abreviaturas e Símbolos

® : marca registrada	mg : miligrama
% : por cento	mL : mililitro
°C : grau Celsius	mm : milímetro
µg : micrograma	mM : milimolar
µl : microlitro	min. : minuto
µmol : micromol	nm : nanômetro
µS : microsiemens	NTU : unidades nefelométricas de turbidez
ABTS : 2,2'-azino-bis-etilbentiazolina	OPD : o-fenilenediamine dihydrochloride
anti-PG : anticorpo anti-poligalacturonase	PAGE : eletroforese em gel de poliacrilamida
BSA : albumina de soro bovino	PBS : Phosphate Buffered Saline
cm : centímetro	PG : poligalacturonase
Da : Dalton	PGL : poligalacturonato liase
DA : acetilação	pl : ponto isoelétrico
DAB : 3,3' diaminobenzidina peroxidase	PMG : polimetilgalacturonase
DE : metil esterificação	PMGE : polimetilgalacturonato esterase
DEAE : dietilaminoetil	PMGL : polimetilgalacturonato liase
DNS : ácido 3',5'-dinitrosalicílico	p/v : peso por volume
EC : "Enzyme Commission"	q.s.p. : quantidade suficiente para
EDTA : ácido etilenodiaminotetracético	Rf : fator de retenção
ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay	RG : ramnogalacturonana
g : grama	r.p.m. : rotações por minuto
g : gravidade	SDS : dodecil sulfato de sódio
h : hora	TLC : "thin layer chromatography"
HEPES : (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetano ácido sulfônico)	Tris : trietanolamina
HG : homogalacturonana	TTBS : "Tween-Tris Buffered Saline"
kDa : kilo Dalton	U : unidade
Kg : quilograma	UV : ultravioleta
Km : constante de Michaelis-Menten	V : volt
Log : logaritmo	V_{máx} : velocidade máxima
M : molar	v/v : volume por volume
mA : miliampére	

RESUMO

As enzimas pectinolíticas são produzidas principalmente por fungos filamentosos, podendo ser classificadas em esterases (pectinesterase) e despolimerases (poligalacturonases e liases), sendo que apresentam um alto potencial de uso biotecnológico na extração de azeite de oliva, recuperação de óleos da casca de frutas, clarificação de sucos de fruta, fabricação do vinho e indústria têxtil. O objetivo inicial deste trabalho foi selecionar fungos bons produtores de pectinases, isolados de amostras de solo ou plantas de várias regiões do Estado de São Paulo, de acordo com o Programa BIOTA, destacando-se *Paecilomyces variotii*. As condições para produção enzimática foram determinadas, utilizando o meio de cultivo Czapeck, pH 7,0, suplementado com pectina cítrica 1,25% como fonte de carbono, inoculado com 10^5 esporos, a 30°C, sem agitação, por 5 dias. O fungo se desenvolveu em uma ampla faixa de pH (3-8), concentração osmótica (0-2,5% NaCl), e temperatura de até 40°C, o que o caracteriza como um microrganismo tolerante a ambientes extremos.

O processo de purificação foi realizado através de cromatografia de troca iônica (DEAE-Fractogel) e cromatografia de filtração (Sephadex G-100), onde obteve-se uma única forma de poligalacturonase, com fator de purificação de 10,1 vezes e 47,2% de recuperação.

O grau de homogeneidade foi verificado em PAGE 12% e o caráter pectinolítico foi confirmado após revelação dos géis, polimerizados com polipectato de sódio, com vermelho de rutênio. A característica de exo-poligalacturonase foi determinada através de cromatografia em camada delgada. A exo-poligalacturonase apresentou massa molecular de 79,4 kDa, com pH e temperatura ótima de reação

de 4,0 e 65°C. A enzima foi estável até 50°C a uma faixa de pH de 3,0-6,0, por até 24 horas. O ponto isoelétrico e o conteúdo de carboidratos foram de 4,37 e 25%, assim como, os valores aparentes de K_m e $V_{máx}$ foram de 1,84 mg/mL e 432 μ mols açúcares redutores/min/mg prot. Os ensaios enzimáticos na presença de diversos íons metálicos resultaram na redução da atividade enzimática na presença dos compostos $AgNO_3$ (1 e 10mM), $Fe_2SO_4 \cdot 4H_2O$ (1mM), $ZnCl_2$ (10mM), $AlCl_3$ (10mM). Na presença de solventes orgânicos, miscíveis ou imiscíveis em água, a atividade enzimática relativa manteve-se sempre acima de 70%. A exo-poligalacturonase também manteve 89,6% de sua atividade na presença de NaCl 0,5M no meio reacional.

Através de análises em Western Blotting foi possível determinar pouca homologia entre as poligalacturonases produzidas por *Paecilomyces variotii* e *Aspergillus niveus*.

1. INTRODUÇÃO

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 à crescente consciência da valorização 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, 2002).

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 os compostos com 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 celular (PUTZKE & PUTZKE, 2002). Entre estas enzimas encontram-se as amilases, pectinases, xilanases, celulases e proteases, todas com importantes aplicações industriais.

Enzimas foram descobertas na segunda metade do século 19, e desde então têm sido extensivamente utilizadas em diversos processos industriais, por serem extremamente eficientes e altamente específicas. Com o avanço em biotecnologia nas últimas 3 décadas, especialmente nas áreas de genética e engenharia de proteínas, enzimas encontraram seu foco em muitos processos industriais novos. As enzimas microbianas são habitualmente aplicadas em muitos setores ambientais e industriais. A poluição ambiental não é mais aceita como sendo inevitável em nossa sociedade. Durante o último século, houve um maior esclarecimento sobre os efeitos do aumento da poluição, e com isso a pressão pública influenciou tanto a indústria quanto o governo, para que os mesmos tomassem providências a esse respeito.

Atualmente, há um aumento na necessidade de substituir alguns processos químicos tradicionais por processos biotecnológicos envolvendo microrganismos e enzimas como pectinases (BAJPAI, 1999), xilanases (BEG *et al.*, 2000a, b; POLIZELI *et al.*, 2005), celulases (BAJPAI *et al.*, 1999), mananase (MONTEIL *et al.*, 2002), α -galactosidase (CLARKE *et al.*, 2000), lacases e ligninases (BAJPAI, 1999; ONYSKO, 1993), as quais não somente proporcionam uma viabilidade econômica alternativa, mas também apresentam aspectos positivos quanto ao impacto ao meio ambiente.

1.1 Substâncias pécticas

As substâncias pécticas são heteropolissacarídeos com massa molecular variando de 30.000 a 300.000 Da. São encontradas na lamela média e parede primária das plantas superiores, não excedendo a 1% da massa fresca (HUGOUIEUX-COTTE-PATTAT *et al.*, 1996).

O termo 'pectina' é um tanto quanto enganoso desde que seja utilizado para descrever uma única molécula. De fato, pectina descreve uma família de oligossacarídeos e polissacarídeos que possuem características comuns, mas são extremamente diferentes quando se trata de sua estrutura fina (RIDLEY *et al.*, 2001). No entanto, todas as pectinas são ricas em ácido galacturônico (GalA), sendo que a maioria consiste em 65% de GalA.

Homogalacturonana (HG) é um polímero linear consistindo de ligações 1,4 α -D-GalA, enquanto ramnogalacturonana I (RGI) consiste de repetidos dissacarídeos [\rightarrow 4)- α -D-GalA-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow]. Ramnogalacturonana II (RGII) tem um suporte estrutural de HG ao invés de RG, com cadeias laterais complexas ligadas a resíduos de GalA (RIDLEY *et al.*, 2001; WILLATS *et al.*, 2001). Até recentemente, era aceito que domínios de ramnogalacturonana e homogalacturonana constituíam a base estrutural de polímeros pécticos como mostra a Figura 1A. No entanto, uma estrutura alternativa foi recentemente proposta, onde a HG é uma longa cadeia de RGI (Figura 1B) (VINCKEN *et al.*, 2003).

Um fato que não se discute é que pectinas são extremamente complexas e formam um grupo de polímeros estruturalmente diverso. A estrutura fina de pectinas pode ser extremamente heterogênea entre plantas, tecidos e ao nível de parede celular. A extensão das cadeias de vários domínios pode variar consideravelmente, e a composição de açúcares de RGI também pode ser altamente heterogênea. Por outro lado, RGII possui uma estrutura altamente conservada. Além disso, as unidades de GalA no polímero HG, podem ser metil-esterificados e acetilados. A proporção de metil-esterificação (DE) e acetilação (DA) tem um profundo impacto nas propriedades funcionais e as pectinas são tradicionalmente categorizadas como

altamente esterificadas ou pouco esterificadas, com DE maiores ou menores que 50%, respectivamente. (RINALDO, 1996; VORAGEN *et al.*, 1995).

Um gel de pectina é formado quando porções de HG são interligadas para formar uma rede cristalina tridimensional em que água e solutos são presos (Figura 1B). Vários fatores determinam as propriedades gelificantes incluindo temperatura, tipo de pectina, DE, DA, pH, presença de açúcar e outros solutos e cálcio. Em pectinas altamente esterificadas, as zonas de junção são formadas por ligações cruzadas de HGs, através de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre grupos metoxil, ambos resultantes da alta concentração de açúcar e baixo pH. Em pectinas com menor número de esterificações, as zonas de junção são formadas por ligações cruzadas entre cálcio e grupos carboxil livres.

Baseado no tipo de modificações das ligações da cadeia principal, substâncias pécticas são classificadas em protopectinas, ácido péctico, ácido pectínico e pectina (Figura 1).

- **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 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).

A relação entre as substâncias pécticas e outros constituintes de parede celular foi descrita em 1958 por NORTHCOTE *et al.* Esses polissacarídeos ocorrem essencialmente como protopectina insolúvel em água. A síntese ocorre durante os primeiros estágios de crescimento quando a área da parede celular é aumentada. Tecidos lignificados contêm somente pequenas quantidades de material péctico comparados com os tecidos vegetais jovens de crescimento ativo que são particularmente ricos em pectina. De modo geral, os polissacarídeos pécticos são encontrados em quantidades relativamente grandes em tecidos suculentos, tenros, compostos essencialmente de paredes primárias, sob condições de crescimento rápido e alto conteúdo de água. Durante o processo de lignificação, o conteúdo de materiais pécticos em plantas geralmente diminui e, em tecidos duros, como a madeira, eles constituem uma fração desprezível do total das substâncias vegetais.

1.2 Sistema pectinolítico

A degradação da pectina da lamela média resulta na desintegração do tecido pela separação das células, processo denominado maceração (BAILEY & PESSA, 1990).

As enzimas capazes de degradar os polissacarídeos pécticos são conhecidas como enzimas pectinolíticas ou ainda pectinases. São produzidas por um grande número de bactérias, leveduras e fungos, insetos, nematódeos e plantas (WHITAKER, 1991).

Devido a ocorrência geral dos polissacarídeos pécticos numa infinidade de vegetais, os sistemas enzimáticos capazes de degradar estas estruturas são

variados em seus mecanismos de ação e também muito difundidos em sua distribuição.

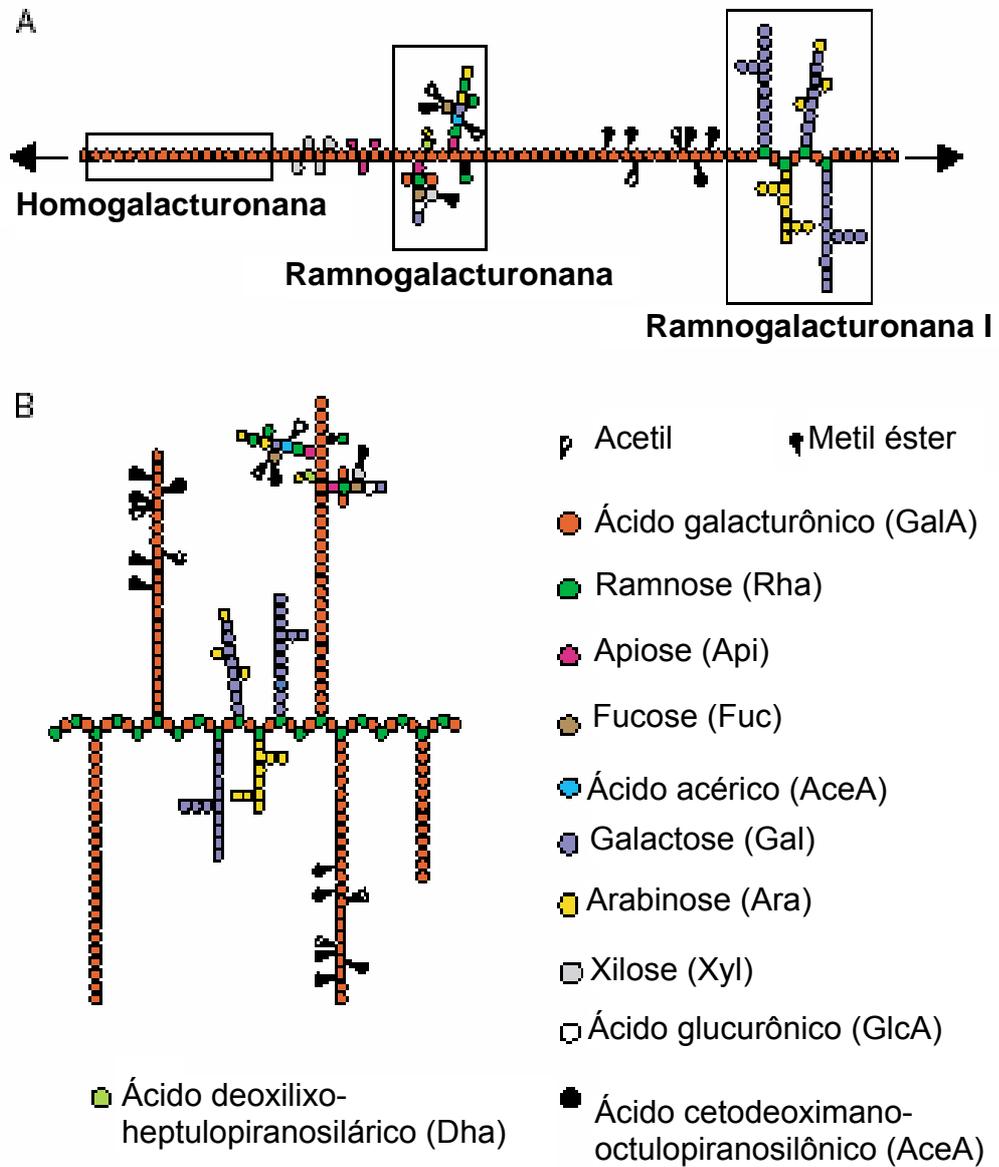


Figura 1: Estrutura básica da pectina. Representação esquemática de uma estrutura convencional (A) e uma estrutura alternativa proposta recentemente (B) (WILLATS *et al.*, 2006)

A classificação das enzimas pécticas está baseada na sua ação sobre a estrutura poligalacturônica da substância péctica (Figura 2). Como recomendado pelo *Committee on Pectin Nomenclature* (1944), as enzimas pécticas ou pectinolíticas são genericamente chamadas de pectinases e, basicamente podem ser divididas em 3 tipos: enzimas desesterificantes (pectinesterase), despolimerizantes e protopectinases (SAKAI *et al.*, 1993).

Pectinesterase (EC 3.1.1.11; PE): catalisa a hidrólise de ligações éster das substâncias pécticas liberando metanol e ácido péctico.

As **despolimerizantes**, podem ainda ser caracterizadas segundo o tipo de clivagem (hidrólise ou trans-eliminação) e também sobre o modo de ação na molécula do substrato, isto é, por clivagem de ligações glicosídicas ao acaso no interior da molécula (endo-atividade) ou por clivagem de ligações terminais (exo-atividade).

As hidrolases atuam rompendo as ligações glicosídicas entre as unidades galacturônicas pela entrada de uma molécula de água e podem ser classificadas em:

Endopolimetilgalacturonase – (poli (metoxigalacturonídeo) endohidrolase, EC 3.2.1.15; endo-PMG): cliva ao acaso as ligações glicosídicas α -1,4 de pectina altamente esterificada.

Exopolimetilgalacturonase – (poli (metoxigalacturonídeo) exohidrolase, EC 3.2.1.15; exo-PMG): cliva ligações glicosídicas α -1,4 na extremidade não redutora da cadeia de pectina altamente esterificada.

Endopoligalacturonase – (poli (1,4- α -D-galacturonídeo) glicanohidrolase, EC 3.2.1.15; endo-PG): cliva ao acaso as ligações α -1,4 do ácido péctico produzindo mono-, di-, e oligogalacturonatos, como produtos finais de reação.

Exopoligalacturonase – (poli (1,4- α -D-galacturonídeo) galacturonohidrolase, EC 3.2.1.67; exo-PG): catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 na extremidade não redutora da cadeia do ácido péctico.

As **liases** atuam por trans-eliminação formando dupla ligação entre o C-4 e C-5 no monômero liberado da molécula do substrato. As liases podem ser classificadas em:

Endopolimetilgalacturonato liase ou endopectina liase – (poli (metoxigalacturonídeo) endoliase, EC 4.2.2.10; endo-PMGL): é a única despolimerase específica para pectina altamente metoxilada, clivando este substrato ao acaso e produzindo oligogalacturonatos metil éster insaturados.

Exopolimetilgalacturonato liase ou exopectina liase – (poli (metoxigalacturonídeo) exoliase, EC 4.2.2.10; exo-PMGL): causa clivagem na extremidade não redutora da molécula de pectina por um processo de transeliminação.

Endopoligalacturonato liase ou endopectato liase – (poli (1,4- α -D-galacturonídeo) endoliase, EC 4.2.2.2; endo-PGL): cliva ao acaso pectato e pectina pouco metoxilada, produzindo dímeros e trímeros e uma série de oligogalacturonatos insaturados.

Exopoligalacturonato liase ou exopectato liase – (poli (1,4- α -D-galacturonídeo) exoliase, EC 4.2.2.9; exo-PGL): cliva as ligações α -1,4 na extremidade não redutora da cadeia de ácido péctico, liberando produtos insaturados a partir da extremidade redutora do substrato.

Protopectinase: solubiliza protopectina formando pectina solúvel altamente polimerizada.

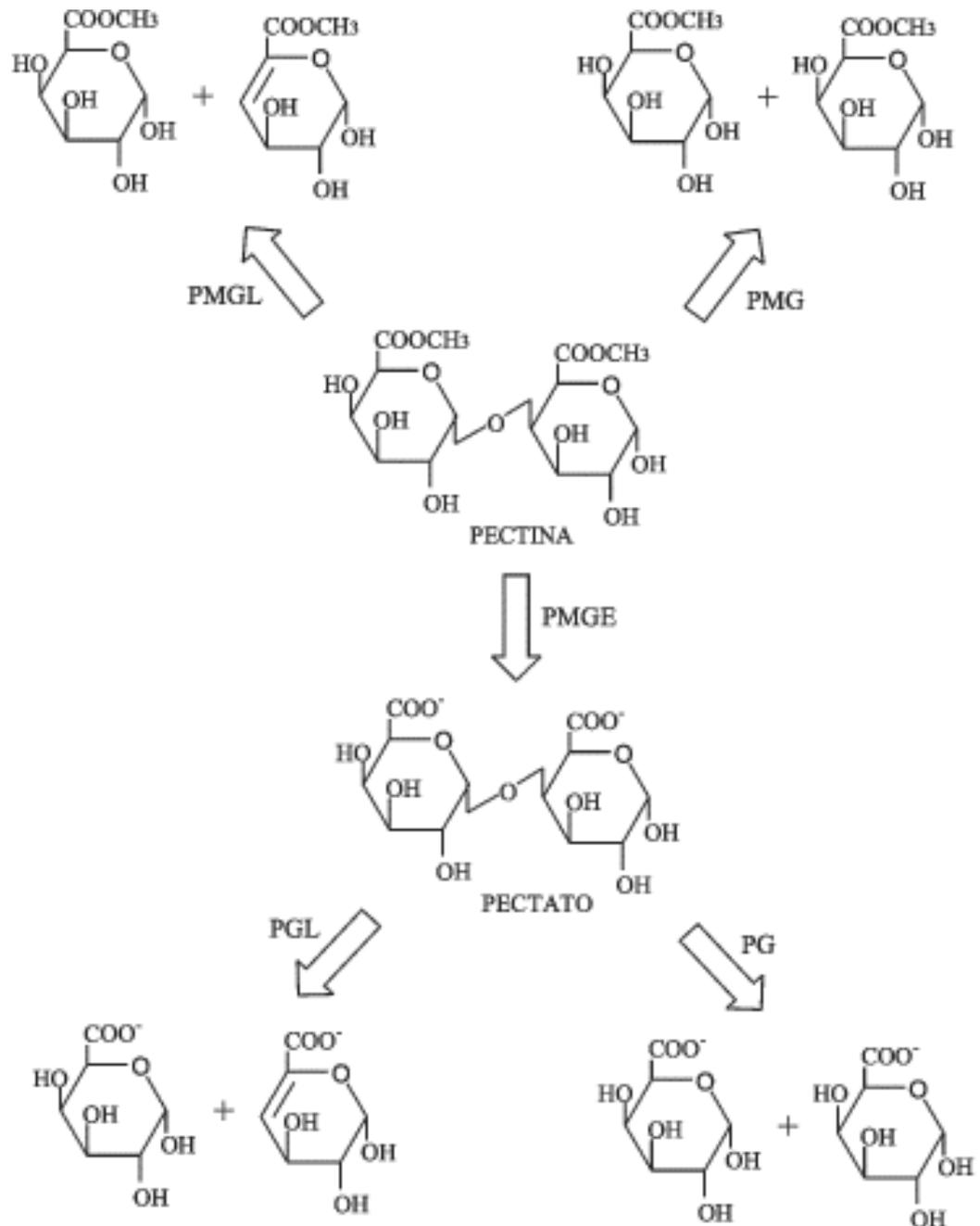


Figura 2: Modo de ação das pectinases em uma molécula de pectina. PMG: polimetilgalacturonase, PMGL: polimetilgalacturonato liase, PMGE: polimetilgalacturonato esterase (pectina esterase), PGL: poligalacturonato liase (pectato liase), PG: poligalacturonase (UENOJO & PASTORE, 2007).

Todas as poligalacturonases, reportadas até o momento, são cadeias únicas de polipeptídeos, e possuem um único motivo estrutural na forma de β -hélice paralela (JENKINS & PICKERSGILL, 2001). Os resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise são 3 aspartatos e os resíduos envolvidos na ligação ao substrato são arginina e lisina (VAN SANTEN *et al.*, 1999). Há um resíduo conservado de histidina responsável por manter o estado peculiar de ionização de um carboxilato envolvido na catálise, compartilhando um próton (ARMAND *et al.*, 2000). Os resíduos descritos são conservados em todas as poligalacturonases originadas de bactérias, fungos e plantas (KESTER *et al.*, 1996). Resíduos de histidina em poligalacturonases são ionizáveis numa faixa de pH de 5,0 a 7,0, e têm sido implicados na dinâmica estrutural e conformacional de proteínas (EVRARD *et al.*, 1999; LIM *et al.*, 1996).

1.3 Ocorrência de enzimas pécticas em leveduras e fungos

A história das pectinases começou com o entendimento da estrutura das substâncias pécticas e o mecanismo pelo qual enzimas pectinolíticas degradam substâncias pécticas. Mais tarde, a produção microbiana de pectinases tornou-se proeminente por muitas décadas. Muitos microrganismos como bactérias, leveduras e fungos podem produzir pectinases. Entre os microrganismos descritos encontram-se *Fusarium solani*, *Aureobasidium pullulans*, *Selenomonas ruminantium*, *Aspergillus niger*, *Penicillium griseoroseum*, *Candida macedoniensis*, *Fusarium oxysporum*, *Saccharomyces fragilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Rhizoctonia fragariae* (SATHYANARAYANA & PANDA, 2003).

O estudo de propriedades bioquímicas de enzimas vem sendo bastante divulgado em várias espécies de levedura. Os primeiros autores a descrever a

produção de uma endopoligalacturonase (endo-PG) por leveduras foram LUH & PHAFF em 1951, em *Saccharomyces fragilis*. Em 1954, os mesmos autores publicaram um estudo das propriedades destas enzimas em comparação com aqueles divulgados para fungos. Em 1953, ROELOFSEN divulgou a habilidade de certas leveduras em atacar a pectina da parede celular, indicando que elas contêm PG. Estas leveduras eram pertencentes aos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*, incluindo linhagens de *S. fragilis* e sua forma imperfeita *Candida pseudotropicalis*. Muitas das cepas foram isoladas de cacau fermentado de Java (Indonésia) e África Ocidental. BELL & ETCHELLS (1956) descreveram a habilidade de certas leveduras tolerantes ao sal em hidrolisar a pectina. WIMBORNE & RICKARD (1978) caracterizaram uma enzima péctica produzida por uma cepa de *S. fragilis* como sendo uma PG e LIM *et al*, 1980, divulgou a presença de múltiplas formas de endo-PGs nesta levedura.

Desde 1980 até o presente, a habilidade de produzir enzimas pécticas é descrita em várias outras espécies de levedura. Estas incluem *Cryptococcus albidus* (FEDERICI, 1985), a qual produz uma endo-PG induzível que está envolvida, junto com alguns fungos filamentosos, na decomposição de frutas em conserva. Além disso, pectinases foram encontradas em *Kluyveromyces marxianus*, que produz uma endo-PG importante no desarranjo da camada pectinácea circundante de grãos de café e cacau durante o processamento (BARNBY *et al.*, 1990; SCHWAN *et al.*, 1997).

Em relação à presença de enzimas pécticas em *S. cerevisiae*, como mencionado acima, os primeiros autores a pesquisarem sobre tal forma LUH & PHAFF (1954) analisaram 140 diferentes cepas pertencentes a esta espécie e relataram que nenhuma delas apresentou esta habilidade. Porém, em 1956, BELL &

ETCHELL descrevem que algumas cepas de *S. cerevisiae* demonstraram alguma atividade pectinolítica. Alguns estudos relacionados a este assunto chamaram muita atenção até a publicação de MCKAY (1990), que relatou a degradação de ácido poligalacturônico (PGA) por duas cepas de *S. cerevisiae*. Também, em 1994, GAINVORS *et al.* relatou a atividade de PG, PE e PL em cepas SCPP 2180 desta espécie e BLANCO *et al.* (1994) caracterizou uma endo-PG da cepa selvagem 1389, como também, diferenças entre esta enzima e uma sintetizada pela cepa IM1-8b, modificada geneticamente (BLANCO *et al.*, 1997).

A aparente contradição entre os resultados encontrados por LUH e PHAFF (1951) e aqueles de outros autores em anos mais recentes poderia ser devido ao método de estudo empregado em cada caso. Os primeiros autores verificaram a habilidade de leveduras em clarificar uma solução de pectina, considerando que mais recentemente, métodos permitem a visualização de halos de hidrólise em placas.

Em relação a fungos, pectinases produzidas por *Aspergillus niger* são as mais extensamente utilizadas na indústria. Este fungo produz várias pectinases incluindo polimetilgalacturonase (PMG), poligalacturonase (PG) e pectinesterases (PE). Uma nova abordagem são as técnicas de recombinação genética pela qual enzimas pecticas específicas podem ser expressas em diferentes hospedeiros. Para se conseguir isto, a proteína original deve ser purificada e caracterizada para determinar sua seqüência de aminoácidos. Para este propósito, vários pesquisadores têm focado suas pesquisas em purificação, estabilidade e performance catalítica de pectinases de várias fontes (SATHYANARAYANA & PANDA, 2003).

1.4 Aplicações de pectinases no setor comercial

Pesquisas com celulasas e demais polissacaridasas foram iniciadas aproximadamente em 1950 e demonstraram seu enorme potencial para converter lignocelulose, uma das mais abundantes e renováveis fontes de energia da Terra, em glicose e açúcares solúveis (COUGHLAN, 1985a,b; REESE, 1976; REESE & MANDELS, 1984).

Da mesma forma, pesquisas com pectinases revelaram seu potencial biotecnológico em vários ramos da indústria, incluindo alimentos, cervejaria, vinho, ração animal, têxtil, indústria de polpa de frutas, papel e agricultura.

Hoje, as enzimas são comumente usadas para muitas aplicações industriais, por isso a demanda em estudos de estabilidade, aumento de atividade e especificidade estão crescendo rapidamente. No período de Janeiro/2006 a Setembro/2007 o Brasil comercializou cerca de 291 milhões de dólares em enzimas, somando-se o total de exportações e importações (ALICE-Web, 2007).

A Indústria Européia é responsável por 60% da produção mundial de enzimas, e os demais 40% são produzidos por USA e Japão. Também, aproximadamente 75% das enzimas industriais são hidrolases.

Pectinases começaram a ser utilizadas na indústria de alimentos já em 1930 (KERTESZ, 1930). Hoje, celulasas, hemicelulasas e pectinases são responsáveis por 20% do mercado mundial de enzimas (MANTYLA *et al.*, 1998).

1.4.1 Pectinases ácidas

1.4.1.1 Extração e clarificação de sucos de fruta e vegetais

Por volta de 1930, quando as indústrias de frutas iniciaram a produção de suco, o rendimento era muito baixo, e muitas dificuldades foram encontradas na filtração deste produto e conseqüentemente em sua clarificação. Subseqüentemente, pesquisas com pectinases, celulases e hemicelulases de microrganismos (*Aspergillus niger* e *Trichoderma sp.*), junto com um aumento no conhecimento da composição das frutas, ajudaram a superar essas dificuldades (GRASSIN & FAUQUEMBERGUE, 1996). Rotineiramente, a combinação de pectinases (pectina liase, pectina metilesterase, endo e exo-poligalacturonases, pectina acetilesterase, ramnogalacturonase, endo- e exo-arabinases), celulases e hemicelulases – coletivamente chamadas enzimas de maceração – são utilizadas na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais (GALANTE *et al.*, 1998; GRASSIN & FAUQUEMBERGUE, 1996).

Durante a produção de sucos de fruta como maçã e pêra, todas as frutas são trituradas formando uma massa, que, após processamento mecânico, resultam em um suco de frutas límpido e uma fase sólida chamada polpa (GALANTE *et al.*, 1998). O uso de enzimas de maceração aumenta tanto o rendimento quanto o desempenho do processo sem um grande investimento inicial. Enzimas de maceração são geralmente usadas em dois passos: (1) após a trituração, para macerar a polpa da fruta com liquefação parcial ou completa, o que não somente aumenta o rendimento do suco e reduz o tempo de processamento, mas também aumenta a extração dos componentes nutritivos da fruta, e (2) após a extração do suco, onde pectinases são utilizadas para clarificação, diminuindo desse modo a

viscosidade do suco de fruta antes da concentração, aumentando a taxa de filtração e a estabilidade do produto final.

1.4.1.1.1 Maçã

Sucos de maçã manufacturados naturalmente e na ausência de um processo de filtração ou clarificação, contém uma grande percentagem de polpa; para a obtenção de um produto comercialmente aceitável, o mesmo deve ser centrifugado para remoção de partículas maiores e finalmente filtrado para resultar em um aspecto límpido. Embora pectinases que podem depolimerizar pectinas altamente esterificadas, sejam as enzimas mais utilizadas no processamento de sucos de maçã, elas não são as únicas enzimas utilizadas para este fim. A combinação de pectinases e celulasas tem demonstrado rendimentos próximos a 100% (ALKORTA *et al.*, 1998).

Outro potencial contribuinte para a turbidez é o amido. Maçãs não maduras podem conter por volta de 15% de amido. Este pode ser eliminado pela utilização de amilases ativas no pH do suco de maçã (3,5-4,0), adicionadas ao mesmo tempo que pectinases.

Enzimas pécticas são utilizadas na preparação de suco de maçã para facilitar a pressagem ou a extração do suco e para auxiliar na separação de precipitados floculentos por sedimentação, através de centrifugação ou filtração. SCHOLS *et al.* (1990) descreveram uma nova pectinase chamada ramnogalacturonase e seu papel na maceração da maçã. Esta enzima foi encontrada inicialmente em *Aspergillus aculeatus*, mas também é produzida por outros *Aspergillus* spp. Tratamento com pectinase pode variar de 15 minutos a 2 horas dependendo da natureza da enzima e o quanto ela é utilizada (KILARA, 1982).

1.4.1.1.2 Produção de vinho

Nas últimas quatro décadas, tentativas têm sido realizadas para aperfeiçoar as cepas de leveduras utilizadas para fermentação de suco de uva, como também para enzimas microbianas extracelulares, durante a fabricação de vinho. As três principais enzimas extracelulares utilizadas na produção de vinhos são pectinases, β -glucanases e hemicelulases. Os principais benefícios do uso destas três enzimas durante a fabricação de vinhos incluem: (1) maior facilidade na clarificação e filtração e (2) melhora na qualidade e estabilidade do vinho (GALANTE *et al.*, 1998).

A primeira enzima microbiana utilizada na indústria de vinho foi uma pectinase comercial de *Aspergillus*. A adição de pectinase, durante o esmagamento das uvas, melhora a extração do suco, reduz o tempo de clarificação e aumenta o conteúdo de terpeno do vinho. Igualmente, preparações de pectinases com alta atividade de pectina liase e baixa atividade de pectina metilesterase são preferidas para minimizar a liberação de metanol proveniente do ácido poligalacturônico metilado durante a produção de vinho (GALANTE *et al.*, 1998).

1.4.1.1.3 Laranja

Em contraste à pectina da maçã, que é altamente metilada, a pectina da laranja é somente parcialmente metilada. Isto porque, o suco de laranja contém naturalmente uma grande quantidade de pectinesterases que clivam grupos metoxil das moléculas de pectina. Na presença de íons cálcio, forma-se pectato de cálcio insolúvel no suco de laranja resultando na precipitação indesejável de partículas. Dois métodos são amplamente adotados para prevenir isto: o primeiro é desnaturar a pectinesterase através do aquecimento do suco. Infelizmente este processo interfere no flavor do produto. Uma alternativa é congelar o suco concentrado, mantendo a

enzima em seu estado inativo. O suco de laranja geralmente é comercializado desta forma, no entanto, a concentração e o congelamento são muito onerosos para o armazenamento e o transporte.

No processo de extração do suco, pectinases podem ser utilizadas em dois estágios: podem ser adicionadas no final da extração da polpa ($0,5 \pm 2,0$ g em 100 Kg de polpa, a temperatura ambiente), para reduzir a viscosidade ou pode ser adicionada logo após o término do processo de fabricação na mesma concentração, a temperatura ambiente, por 30 minutos (REBECK, 1990). Isto favorece uma melhor extração de açúcares e sólidos solúveis, resultando em um maior rendimento e redução da viscosidade.

1.4.1.1.4 Limão

O método tradicional de clarificação de suco de limão se dá pela presença natural de pectinesterases. Os compostos responsáveis pela turvação são obtidos principalmente da casca da fruta. A casca e a polpa são trituradas em partículas de 3 ± 5 mm e misturadas com água (1:1), aquecidas a 95°C para destruir a pectina metilesterase, e resfriadas a 50°C . A mistura obtida contém grande quantidade de pectina, outros polissacarídeos, glicoproteínas e óleos essenciais. Esta é tratada com pectinases ou pectinases mais celulasas. Após 1 hora, a mistura é direcionada para finalização do processo e o extrato líquido, se necessário, pode ser novamente despectinizado com enzima. Por fim, segue-se centrifugação, pasteurização, concentração, engarrafamento e venda.

1.4.1.1.5 Ração animal

Pectinases são utilizadas em conjunto com outras enzimas para reduzir a viscosidade da ração animal, a fim de aumentar a absorção e a liberação de nutrientes através da hidrólise das fibras não biodegradáveis e dos nutrientes bloqueados pelas fibras (SHARMA & SATHYANARAYAMA, 2006).

1.4.2 Pectinases alcalinas

1.4.2.1 Extração de óleo de oliva

Nos últimos anos, o óleo oliva tem atraído o mercado mundial devido aos seus numerosos apelos de saúde. A extração de óleo de oliva envolve: (1) esmagamento de azeitonas em um moinho de pedra ou de facas; (2) passagem da pasta resultante em uma série de malaxadores e decantadores horizontais; e (3) centrifugação em alta velocidade para recuperar o óleo. As principais vantagens da utilização de enzimas de maceração durante a extração do óleo de oliva são: (1) aumento da extração do óleo (até 2 Kg de óleo a cada 100 Kg de azeitonas); (2) melhor fracionamento durante a centrifugação; (3) obtenção de óleo com altos níveis de anti-oxidantes e vitamina E; e (4) diminuição da rancificação (GALANTE *et al.*, 1998).

1.4.2.2 Fermentação de chá e café

Pectinases possuem um papel importante na fermentação de chá e café. A fermentação de café com microrganismos pectinolíticos é utilizada para remover a camada de mucilagem presente nos grãos de café. Algumas vezes, enzimas pécticas são adicionadas para remover a camada polposa do grão. Celulases e

hemicelulases presentes nas preparações enzimáticas auxiliam a digestão da mucilagem. Uma preparação enzimática comercial é pulverizada sobre os grãos (2 ± 10 g por tonelada a $15\pm 20^\circ\text{C}$). O estágio de fermentação do café é acelerado e reduzido de 40 a 80 horas para 20 horas com tratamento enzimático (AMORIM & AMORIM, 1977; CARR, 1985; GODFREY, 1985).

1.4.2.3 Indústria têxtil

Enzimas pectinolíticas podem ser usadas nas indústrias têxteis para degradar a camada de pectina que recobre as fibras de celulose, liberando-as para posterior processamento (PICCOLI-VALLE *et al.*, 2001), no tratamento do resíduo líquido e na degomagem das fibras naturais (KAUR *et al.*, 2004).

Pectinases alcalinas são utilizadas para maceração das fibras vegetais, como linho, cânhamo e juta, na biopreparação de algodão e no polimento enzimático de tecidos mistos de juta e algodão (KAUR *et al.*, 2004).

A degomagem de fibras de rami com pectina liase produz fibras com qualidade superior àquelas produzidas por complexos enzimáticos comerciais ou utilizando processo químico com soda alcalina, além de reduzir a poluição ambiental provocada pela liberação da soda cáustica (SILVA *et al.*, 2005).

Em algodão cru, a remoção da pectina, cera e agentes de goma com a utilização de pectinases em conjunto com amilases, lipases e hemicelulases em condições adequadas, substitui o uso da soda cáustica e gera produtos de alta qualidade, para posterior tingimento e processo de tecelagem com menor consumo de energia (SAWADA & UEDA, 2001).

1.4.2.4 Indústria de papel e celulose

Durante a fabricação de papel, pectinases podem despolimerizar substâncias com pectina e, subseqüentemente, diminuir a demanda catiônica das soluções pécticas e do filtrado resultantes do branqueamento com peróxido, solucionar problemas de retenção no branqueamento mecânico da celulose e no tratamento dos efluentes dos moinhos de papel (SHARMA & SATHYANARAYAMA, 2006).

1.5 Fungos filamentosos para produção de enzimas

Fungos filamentosos, os quais podem ser isolados de um grande número de ambientes naturais (solo, matérias orgânicas e como patógenos de plantas e animais), podem usar uma extensa variedade de fontes de carbono e nitrogênio para o seu crescimento. Estes diferentes habitats e a competição com outros microrganismos presentes nestes, provavelmente realçam a extraordinária diversidade metabólica de muitos fungos filamentosos. A grande extensão de padrões biossintéticos e catabólicos necessários para esta diversidade metabólica faz dos fungos filamentosos organismos de grande potencial de produção de uma extensa faixa de metabólitos primários e secundários de baixa massa molecular, e também de enzimas hidrolíticas intra e extracelulares (VERDOES *et al.*, 1995).

O potencial industrial dos fungos filamentosos tem estimulado pesquisas para o desenvolvimento de processos de fermentação em larga escala, purificação de enzimas e métodos para melhoramento de linhagens, resultando em uma melhor contribuição do uso dos fungos na indústria atual (VERDOES *et al.*, 1995).

1.5.1 *Paecilomyces variotii*

Paecilomyces variotii pertence à classe dos *Ascomycetes* (SAMSON, 1974), que segundo PELCZAR, 1996, são denominados “fungos superiores”, principalmente porque possuem estrutura consideravelmente mais complexa do que os outros fungos. Esta é uma classe diversificada e economicamente importante, que compreende dezenas de milhares de espécies.

Os membros dos ascomicetos incluem as formas leveduriformes, miceliais e fungos dimórficos. O micélio, quando presente, é septado e suas células podem possuir um ou mais núcleos. Os ascomicetos distinguem-se de outros fungos pela produção de esporos sexuais denominados **ascósporos** contidos em **ascos**. Tipicamente, possuem oito ascósporos em cada asco. Dependendo da espécie, podem conter de dois a qualquer número múltiplo de oito. Excetuando-se uns poucos casos, os ascomicetos produzem ascos no interior de corpos de frutificação sexuais denominados **ascocarpos**. Há vários tipos de ascocarpos, cada um característico de uma espécie.

Os esporos assexuais (conídios) do micélio de ascomicetos são produzidos na extremidade das hifas e apresentam-se geralmente em cadeias. Dependendo da espécie, podem ser nus ou podem ser produzidos no interior de corpos de frutificação assexuais.

Paecilomyces variotii é caracterizado por colônias de crescimento rápido à temperatura ambiente, coloração marrom-amarelada e superfície pulverulenta. Apresentam conidióforos ramificados, fiáides em grupos ou solitárias terminando em uma alongação cilíndrica e de tamanhos variáveis. Os conidióforos hialinos são de parede lisa, marrom-amarelados em massa, variáveis em forma e tamanho, que podem ser elipsoidais, cilíndricos ou clavados. Os clamidósporos estão presentes

em grande quantidade. Esta espécie é termotolerante e consegue crescer em ambientes extremos, é comum no ar, no solo, em madeira e alimentos (SAMSON, 1974).

2. OBJETIVOS

Muitos microrganismos, bactérias, leveduras e fungos, podem produzir pectinases.

Pesquisas com pectinases revelaram seu potencial biotecnológico em vários ramos da indústria, incluindo alimentos, cervejaria, vinho, ração animal, têxtil, indústria de polpa de frutas, papel e agricultura.

Em vista das considerações apresentadas, este trabalho teve como objetivos principais:

- a) "Screening" de fungos ainda não descritos como produtores de pectinases;
- b) Padronizar as condições de crescimento e produção do complexo pectinolítico por *Paecilomyces variotii*;
- c) Purificar e caracterizar bioquimicamente uma poligalacturonase;
- d) Produção de anticorpos policlonais anti-poligalacturonase extracelular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e isolamento dos fungos

As coletas foram realizadas pelo Doutorando Tony Márcio da Silva (processo FAPESP nº 05/54133-5) em regiões do Estado de São Paulo, como a Floresta Estadual de Bebedouro e termas dos Laranjais em Olímpia. Amostras de solo, materiais em decomposição, folhas, frutos, ou água doce, foram coletadas seguindo-se normas estabelecidas pela FAPESP. Os locais foram geo-referenciados por GPS-“Global Positioning Systems” etrex, Garmin, 12 canais, onde foi determinada latitude, longitude, precisão do aparelho e altitude. Foram registradas a data, hora e temperatura ambiente do momento da coleta. Para as amostras líquidas foram anotadas a condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$), oxigênio dissolvido (mg/mL), pH, turbidez (NTU), e demais informações sobre o ecossistema local, habitat e/ou microhabitat, localização geral, área ripária, sempre de acordo com a ficha padrão para coletas e registro BIOTA/FAPESP, disponível no site: <http://sinbiota.cria.org.br>.

Para isolamento dos fungos filamentosos, a metodologia adotada foi a de plaqueamento com diluições sucessivas, onde suspensões das amostras coletadas, contendo traços de pentabiótico veterinário, foram inoculadas em distintas diluições em placas de Petri contendo meio de cultura constituído por farinha de aveia 4% e ágar bacteriológico 2%. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, em temperaturas entre 35-40°C, para crescimento preferencial de fungos termotolerantes ou termofílicos. Em seguida, foi realizado o processo de isolamento das diferentes cepas, de acordo com observação macroscópica, quanto à cor dos esporos; mudança de cor do meio de cultura provavelmente devido à formação de metabólitos secundários; textura (liso, enrugado, hifas aéreas, etc).

3.2 Pré-seleção de microrganismos pectinolíticos em fermentação líquida

Uma suspensão aquosa de esporos (10^5 esporos/mL) foi obtida junto às culturas isoladas, por raspagem da superfície da cultura com alça de platina e adição de 10 mL de água destilada. Parte desta suspensão de esporos (1 mL) foi vertida em 25 mL de meio Czapeck (WISEMAN, 1975), tendo pectina cítrica Sigma® 1% como fonte de carbono, sendo o meio contido em frascos Erlenmeyer de 125 mL devidamente esterilizados. O material inoculado foi homogeneizado e mantido em estufa a 35°C, por 72 horas, sob agitação de 100 rpm.

Também participaram do “screening” fungos já identificados até o momento no projeto Biota. Para tal seleção foram utilizadas as cepas já identificadas de *Paecilomyces variotii*, *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*, *Penicillium herquei*, *Aspergillus niveus* e *Aspergillus caespitosus*.

3.3 Manutenção das cepas em laboratório

A manutenção rotineira das cepas em laboratório está sendo realizada em placas de Petri estéreis contendo de 20 a 30 mL de meio de aveia solidificado. São realizados repiques periódicos mantendo-se as cepas em estufa a 35°C, por aproximadamente dez dias. Em seguida, as cepas são conservadas em geladeira por um período de até 30 dias.

A manutenção do fungo selecionado foi feita em sílica gel, onde uma suspensão de esporos foi preparada em 5 mL de solução de leite Molicco desnatado (20g/100 mL de água destilada). Desta suspensão, aproximadamente 1,2 mL foram misturados a 6 g de sílica gel branca 1-4 mm contida em tubos de ensaio (16 x 100 mm) vedados com rosca.

3.4 Meios para a manutenção das cepas

As cepas são mantidas em meio BDA ou meio de aveia contidos em placas de Petri e em tubos de ensaio, inclinados e mantidos sob refrigeração.

Meio BDA

- Batata.....30g
- Glicose.....2,0g
- Ágar bacteriológico.....2,0g
- Água destilada q.s.p.100mL

As batatas foram cozidas, maceradas na própria água utilizada para o cozimento e filtradas, sendo o filtrado utilizado para a preparação do meio.

Meio de aveia

- Farinha de aveia Quaker.....4,0g
- Ágar bacteriológico.....2,0g
- Água destilada q.s.p.....100mL

Os meios foram autoclavados por 20 minutos a 1,5 atm.

3.5 Obtenção dos conídios

Uma suspensão aquosa de conídios foi obtida junto às culturas estoques, por raspagem da superfície da cultura com alça de platina e adição de água destilada estéril. Esta suspensão de conídios foi agitada para a homogeneização e contada em câmara de Neubauer, para em seguida, realizar-se o inóculo.

3.6 Obtenção das culturas em meio líquido

As culturas foram obtidas mediante inóculo de 1,0 mL de uma suspensão com 10^5 esporos por mL, ressuspensos em água destilada, em meio Adams (ADAMS, 1990), SR (RIZZATTI *et al.*, 2001), Khanna (KHANNA *et al.*, 1995), Vogel (VOGEL, 1964) e Czapeck (WISEMAN, 1975), em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio. Os meios foram suplementados com distintas fontes de carbono (indutoras e repressoras, segundo POLIZELI *et al.*, 1996) e incubados a 35°C, sob agitação orbital a 100 rpm, por 72 horas ou por diferentes períodos, conforme determinado para cada experimento. Galactose 1%, polipectato de sódio 1%, ácido monogalacturônico 1%, além de pectina 1% foram testados conforme CROTTI *et al.* (1996, 1998). A indução do complexo pectinolítico por resíduos, como casca de maçã (*Malus domestica* Borkh), casca de laranja (*Citrus sinensis* Osbeck), casca de maracujá (*Passiflora edulis*), casca de limão (*Citrus aurantifolia* var. tahiti) ou outros com alta porcentagem de pectina na sua constituição, também foi investigada.

Meio Adams (ADAMS, 1990)

- Extrato de levedura.....0,2g
- KH_2PO_4 0,1g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,05g
- Pectina.....1g
- Água destilada q.s.p100mL

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

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

Solução de sais de Khanna [20X]

• NH ₄ NO ₃	2,0g
• KH ₂ PO ₄	1,3g
• MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,362g
• KCl.....	0,098g
• ZnSO ₄ .H ₂ O.....	0,007g
• MnSO ₄ .H ₂ O.....	0,0138g
• Fe ₂ (SO ₄) ₃ .6H ₂ O.....	0,0066g
• CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,0062g
• 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.....	1,0g
• Água destilada q.s.p.....	100mL

Solução de sais SR [20X]

• MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,24g
• KH ₂ PO ₄	0,3g
• NH ₄ H ₂ PO ₄	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
- KH_2PO_4 25g
- NH_4NO_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_2O5g
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$5g
- $\text{Fe}_2(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$1g

• CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,25g
• H ₃ BO ₃	0,05g
• MnSO ₄ .H ₂ O.....	0,05g
• Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	0,05g
• Clorofórmio.....	1mL
• Água destilada q.s.p.....	100mL

Meio Czapek (WISEMAN, 1975)

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

3.7 Obtenção de enzimas extracelulares e extração das enzimas intracelulares

Culturas obtidas dos meios utilizados, como descritos anteriormente foram filtradas sob vácuo em funil de Büchner, obtendo-se um filtrado livre de células e um micélio. O filtrado foi dialisado e utilizado para a determinação das atividades pectinolíticas extracelulares. 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 ressuspensão em 10 mL de

solução tampão (acetato de sódio 100mM, pH 4,0) e centrifugado a 12000 g, 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 e para representação do crescimento através de dosagem de proteínas totais.

3.8 Diálise das amostras

Os filtrados das culturas foram colocados em sacos de diálise (membrana de celofane) e dialisados, a 4°C por 12 horas, contra água deionizada. Durante a diálise foram realizadas duas trocas de água. As amostras dialisadas foram utilizadas para as determinações de atividades enzimáticas.

3.9 Dosagens enzimáticas

3.9.1 Dosagem da atividade de poligalacturonase, amilase, xilanase e invertase

A determinação da atividade de poligalacturonase (endo e exo), amilase, xilanase e invertase, se deu através da reação com ácido 3', 5' dinitrosalicílico (DNS), descrito por MILLER (1959), onde 250µL de amostra enzimática foram incubados com 250 µL da solução de substrato (polipectato de sódio, amido, xilana ou sacarose 1% (p/v), respectivamente) dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0. A temperatura do ensaio foi de 50°C. Desta mistura de reação foram retiradas alíquotas de 100 µL de 10 em 10 minutos, durante 20 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, adicionou-se 1,0 mL de água destilada. A leitura da

absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm contra um branco que representa o tempo zero da reação. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de açúcar redutor, por minuto, nas condições de ensaio. O termo atividade relativa, dado em porcentagem, faz referência à atividade enzimática nas condições ótimas de pH e temperatura.

3.9.2 Dosagem da Pectato Liase

A atividade de pectato liase foi determinada segundo o método de NAGEL & ANDERSON (1965) descrito por COLLMER *et al* (1988). A reação foi constituída de uma mistura de 2,5 mL da solução estoque (polipectato de sódio 0,24% em tampão Tris-HCl 60mM, pH 8,5, CaCl_2 0,6 mM) e 0,5 mL da amostra enzimática em uma cubeta, sendo que as soluções foram previamente equilibradas a 30°C. O aumento subsequente na absorbância a 232 nm pela formação de produtos 4,5 insaturados foi acompanhado como uma função do tempo em um espectrofotômetro. Uma unidade de enzima forma 1 μmol de produtos 4,5 insaturados, em 1 minuto, nas condições de ensaio. O coeficiente de extinção molar para os produtos insaturados a 232 nm é $4600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.9.3 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 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 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.

3.9.4 Dosagem de Manganês Peroxidase (MnP) – atividade em UV

A mistura de reação consistiu em 800 μL de tampão lactato de sódio 50 mM, pH 4,5, 100 μL de sulfato de manganês 0,5 mM e 100 μL de enzima. A reação foi iniciada pela adição de 10 μL de peróxido de hidrogênio. Após 10 minutos as amostras foram submetidas à leitura de absorbância em espectrofotômetro a 270 nm em cubeta de quartzo. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de Mn^{+3} por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $8,1 \times 10^3/\text{mol}/\text{cm}$ (GLENN *et al.*, 1986; AITKEN & IRVINE, 1990).

Uma reação controle foi preparada substituindo-se o substrato por água destilada.

3.9.5 Dosagem de Lignina Peroxidase (LiP) – atividade em UV

A mistura de reação consistiu em 800 μL de tampão tartarato de sódio 50 mM, pH 3,0, 100 μL de álcool veratrílico 40 mM e 100 μL de enzima. A reação foi iniciada pela adição de 20 μL de peróxido de hidrogênio. Após 10 minutos as amostras foram

submetidas à leitura de absorvância em espectrofotômetro a 310 nm em cubeta de quartzo. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de veratraldeído por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $9,3 \times 10^3/\text{mol}/\text{cm}$ (TIEN & KIRK, 1988).

Uma reação controle foi preparada substituindo-se o substrato por água destilada.

3.9.6 Lacase

A mistura de reação consistiu em 900 μL de tampão acetato de sódio, 2,2"-azino-bis-etilbenthiazolina (ABTS) 100 mM, pH 5,0 e 100 μL de enzima. Esta mistura foi incubada por 1 minuto em banho-maria a 30°C, sendo a reação interrompida com 10 μL de azida. As amostras foram submetidas à leitura de absorvância em espectrofotômetro a 420 nm em cubeta de vidro. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $3,6 \times 10^4/\text{mol}/\text{cm}$ para o ABTS oxidado (BOURBONNAIS & PAICE, 1988).

Uma reação controle foi preparada substituindo-se o substrato por água destilada.

3.10 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 é definida como mg de proteína/mL.

3.11 Condições de cultivo em meio substrato sólido

O fungo *Paecilomyces variotii* foi cultivado em meio substrato sólido a 35°C, incubado em estufa bacteriológica com umidade relativa ao redor de 76%, sendo o tempo de cultivo de 120 horas. O meio sólido padronizado compõe-se de:

Fonte de carbono.....	2 g
Água destilada	4 mL

O volume de água destilada adicionada ao meio de cultivo foi sempre o dobro da quantidade de material sólido. O meio foi autoclavado separadamente da água destilada durante 15 minutos a 1,5 atm. O inóculo foi realizado com 1,0 mL de uma suspensão com 10^5 esporos por mL.

3.12 Obtenção do extrato bruto a partir de cultivo em substrato sólido

Após o crescimento do fungo em substrato sólido foram adicionados 50 mL de água destilada, a 4°C, às culturas, que assim permaneceram durante 30 minutos sob agitação por uma barra magnética. Essa mistura foi filtrada com o auxílio de uma bomba de vácuo, funil de Büchner e gaze. O filtrado contendo as enzimas extracelulares foi dialisado em água destilada por, aproximadamente, 12 horas a 4°C.

3.13 Purificação de uma poligalacturonase extracelular em colunas cromatográficas

O extrato bruto obtido em meio de cultivo líquido (Czapeck) utilizando-se pectina como fonte de carbono, foi dialisado durante uma noite, a 4°C, contra

tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,5, e aplicado em uma coluna cromatográfica de troca iônica, DEAE-Fractogel (1,0 x 5,0cm), equilibrada e eluída em tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,5. Após eluição da amostra, aplicou-se um volume de 40 mL deste mesmo tampão (“lavado”). Um gradiente contínuo de 200 mL de cloreto de sódio (0 – 500 mM), também dissolvido no mesmo tampão, foi aplicado para a retirada das proteínas que adsorveram à resina. Durante todo o processo foram coletados 10mL de amostra por tubo.

As frações contendo atividade poligalacturonásica foram reunidas, e o “pool” dialisado durante uma noite, a 4°C, contra água destilada. A mesma foi liofilizada e posteriormente ressuspensa em 2 mL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,0. Esta amostra foi aplicada em coluna cromatográfica de filtração Sephadex G-100 Superfine (2,0 x 85,0 cm), equilibrada e eluída em tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,0. Foi coletado 1mL por tubo, e as frações contendo a atividade poligalacturonásica foram reunidas, dialisadas contra água destilada e utilizadas para os processos de caracterização bioquímica. Todas as frações coletadas foram monitoradas à 280 nm.

3.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes

(PAGE)

Géis de poliacrilamida em condições não desnaturantes foram preparados na concentração de 12%, em placas de vidro (7,8 x 9,2cm), conforme metodologia proposta por DAVIS (1964), para proteínas ácidas. As amostras a serem analisadas foram preparadas contendo 15 µL da amostra enzimática, 5 µL de tampão de corrida, 5 µL de azul de bromofenol 1% e 1 µL de glicerol concentrado. As eletroforeses foram realizadas em tampão de corrida constituído de Tris-HCl 50mM e

glicina 36mM, pH 8,9, a temperatura ambiente. A corrente aplicada foi mantida em 30mA e 120V.

Após o término da eletroforese, os géis foram imersos em solução fixadora composta por metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e formol 0,5% (v/v), durante 1 hora. Posteriormente seguiram-se os processos de revelação com nitrato de prata (BLUM *et al.*, 1987).

No caso do gel PAGE utilizado para detecção de atividade poligalacturonásica, a eletroforese foi realizada a 4°C. Após o término da corrida, o mesmo foi imerso em tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,0, a temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi incubado, com uma solução de pectato de sódio a 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,0, em banho-maria a 60°C por 15 minutos. Por fim, o gel sofreu três lavagens com água destilada e foi imerso em uma solução aquosa de vermelho de rutênio a 0,1% para revelação.

3.14.1 Detecção de proteínas através do método de coloração por nitrato de prata

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

- Dois banhos de 20 minutos de etanol 50% (v/v);
- Banho de 20 minutos em etanol 30% (v/v);
- Banho de 1 minuto em solução de pré-tratamento;
- 3 lavagens com água destilada (20 segundos cada lavagem);
- Banho de 20 minutos em solução de impregnação;
- 3 lavagens com água destilada (20 segundos cada lavagem);
- Banho em solução de revelação;

- Lavagem com água destilada;
- Banho 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).

3.14.1.1 Solução de pré-tratamento

- tiosulfato de sódio..... 0,02g
- água destilada q.s.p..... 100mL

3.14.1.2 Solução de impregnação

- nitrato de prata 0,2g
- formol 37% 75µL
- água destilada q.s.p. 100mL

3.14.1.3 Solução de revelação

- carbonato de sódio6,0g
- tiosulfato de sódio 0,02g
- formol 37% 50µL
- água destilada q.s.p. 100mL

3.14.1.4 Solução inibitória da revelação

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

3.15 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As poligalacturonases produzidas por *Paecilomyces variotii* tiveram suas massas moleculares determinadas por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Para isto, foram utilizados géis de poliacrilamida em condições desnaturantes, em placas de vidro (7,8 x 9,2cm) na concentração de 8%.

As amostras analisadas foram diluídas na proporção de 1:1 em tampão de amostra (glicerol 20,0% (v/v), SDS 4,0% (p/v), azul de bromofenol 0,002% (p/v), β -mercaptoetanol 10,0% (v/v) e Tris-HCl 0,12M, pH 6,75) e aquecidas por três minutos em água fervente. A eletroforese ocorreu a temperatura ambiente, na presença de tampão Tris-HCl 0,025M, glicina 0,19M e SDS 0,1% (p/v), pH 8,3. Foi aplicada uma corrente de 30mA e 120V.

Após o término da eletroforese, os géis foram imersos em solução fixadora durante uma hora. Como marcadores de massa molecular foram utilizadas proteínas padrões variando de 20 a 220 kDa (GibcoBRL[®]).

A massa molecular da poligalacturonase foi estimada através da confecção de um gráfico contendo na ordenada o log da massa molecular dos padrões e na abscissa o coeficiente de relação de migração (Rf) de cada proteína. O Rf foi obtido pela relação de migração entre a proteína e o fronte azul de bromofenol.

3.16 Determinação da massa molecular por cromatografia de filtração em gel

A cromatografia de filtração em gel foi realizada em HPLC equipado com coluna de Bio-sil SEC-400 (30 x 0,78 cm), equilibrada e eluída com tampão HEPES 100 mM, pH 6,8, contendo NaCl 150 mM e azida sódica 10 mM, sob o fluxo de 1,0 mL/min. Frações de 1 mL foram coletadas automaticamente e a atividade

poligalacturonásica avaliada individualmente. Para calibração da coluna foram utilizados os seguintes padrões de massa molecular: globulina (158 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e mioglobina (17 kDa). As amostras foram previamente dissolvidas em 0,02 mL do tampão de eluição e aplicadas separadamente na coluna por injeção manual.

3.17 Cromatografia em camada delgada de sílica do produto de hidrólise (TLC)

A análise dos produtos de hidrólise formados a partir da ação da poligalacturonase purificada sobre o polipectato de sódio 1%, foi obtida por cromatografia ascendente em camada delgada de sílica de 10 x 20 cm (DC-Alufolien Kieselgel 60 sem indicador fluorescente, Merck), seguindo a metodologia descrita por FONTANA *et al.* (1988). A reação ocorreu pela mistura de 200µL das amostras enzimáticas com 200µL de substrato (polipectato de sódio 1% em tampão acetato de sódio 100mM, pH 4,0). A incubação das misturas foi realizada a 60°C. Alíquotas foram retiradas nos tempos desejados e fervidas durante 3 minutos, em seguida, um volume de 10µL foi aplicado nas placas de sílica. Aplicou-se volume idêntico de uma solução padrão constituída de ácido monogalacturônico, ácido digalacturônico e ácido trigalacturônico, a 1% (p/v). A placa foi desenvolvida duas vezes com uma mistura de n-butanol, ácido acético e água destilada na proporção de 5:3:2 (v/v). A revelação dos produtos de hidrólise foi realizada utilizando uma solução de 0,2% de orcinol (p/v) em metanol e ácido sulfúrico na proporção de 9:1, posteriormente, as placas foram colocadas em estufa bacteriológica a 100°C até o aparecimento das bandas correspondentes aos produtos da degradação do polipectato de sódio.

3.18 Determinação da natureza glicoprotéica

A quantificação de carboidratos da poligalacturonase purificada produzida por *Paecilomyces variotii* foi realizada através do método do fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Um volume de 400 μ L da enzima pura sofreu a adição de 10 μ L de uma solução de fenol 80% e 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado sob gelo. Após 10 minutos em repouso, esta mistura foi colocada em banho maria a 30°C por 15 minutos. As leituras da absorbância foram feitas em 490nm. O método foi padronizado por uma curva padrão de manose na concentração de 0 a 1,0 mg/mL.

3.19 Focalização isoeletrica

O ponto isoeletrico (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 2,0 e 5,0. 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 0,5 cm. Os fragmentos do gel controle foram mantidos em 1mL de solução de KCl 25 mM por uma noite. Os fragmentos do gel com a amostra enzimática foram adicionados a 1mL de tampão acetato de sódio 100mM, pH 4,0 por 30 minutos. Decorrido esse período, as fatias do gel controle, tiveram seu pHs mensurados para determinar o gradiente de pH, e as fatias dos géis com a amostra enzimática foram submetidas à reação enzimática.

A determinação do pI da poligalacturonase purificada ocorreu após a construção de um gráfico que continha em uma ordenada (eixo y_1) os valores de

atividade enzimática relativa, no eixo y_2 os valores dos pHs correspondentes ao gel controle e na abscissa a distância do gel, em centímetros, a partir de sua origem.

3.20 Análise cinética: K_m e $V_{máx}$

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ da poligalacturonase purificada foram determinados utilizando-se o substrato polipectato de sódio Sigma[®], em concentrações que variaram de 0,2 a 12 mg/mL. Os valores de K_m e $V_{máx}$ foram calculados através da metodologia desenvolvida por HANES (1932) e a representação gráfica foi obtida através do programa Enzyplot (LEONE *et al.*, 1995). A eficiência catalítica da poligalacturonase frente ao substrato foi determinada pela razão $V_{máx}/K_m$ (CRANE & SOLS, 1953).

3.21 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática da poligalacturonase

A temperatura ótima de atividade da poligalacturonase procedeu-se através da dosagem de açúcares redutores pelo método do D.N.S após incubação da enzima em diferentes temperaturas, 30,40,50,55,60,65,70 e 80°C.

3.22 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da poligalacturonase em ausência de substrato

O estudo da termoestabilidade da poligalacturonase foi determinado a 45°C, 50°C e 55°C, quando a enzima foi incubada por no máximo 90 minutos, nas diferentes temperaturas, seguida da avaliação da atividade enzimática residual pelo método D.N.S. As alíquotas enzimáticas retiradas nos diferentes tempos do experimento, foram mantidas em gelo.

3.23 Efeito do pH sobre a atividade da poligalacturonase

A influência do pH na atividade enzimática foi analisada, solubilizando-se o substrato da reação (polipectato de sódio 1%), em tampão citrato-fosfato 100 mM (tampão McIlvaine), variando o pH entre 2,5 e 8,0. Posteriormente determinou-se a atividade enzimática através de dosagem de açúcares redutores pelo método D.N.S.

3.24 Efeito do pH sobre a estabilidade da poligalacturonase em ausência de substrato

O efeito do pH sobre a estabilidade da poligalacturonase foi investigado pela adição dos tampões citados no item 3.23, ajustados em cada valor de pH estudado. A mistura enzima – tampão permaneceu à 4°C por 24 horas e, em seguida, uma alíquota de 250 µL foi retirada e incubada com a mistura reacional descrita na metodologia, no entanto, para que ocorresse um tamponamento real, utilizou-se tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,0.

3.25 Efeito de íons sobre a atividade enzimática

Para o estudo do efeito de íons sobre a atividade da poligalacturonase, utilizou-se soluções a 100 mM de HgCl₂, NH₄Cl, ZnCl₂, MnCl₂.4H₂O, Fe₂SO₄.4H₂O, NaCl, MgCl₂.6H₂O, AlCl₃, NaBr, AgNO₃, NH₄F, Pb(C₂H₃O₂).3H₂O, NaH₂PO₄, KCl, CuCl₂, CoCl₂.6H₂O e KH₂PO₄ de modo a se obter concentrações de 1 e 10 mM do íon correspondente na mistura de reação. Ensaios com EDTA e β-mercaptoetanol também foram realizados.

3.26 Imunoensaio contra poligalacturonase

3.26.1 Imunização

Duas coelhas New Zealand foram imunizadas por aplicações de injeções contendo a poligalacturonase diluída na proporção de 1:1 com os Adjuvantes utilizados ou com salina 0,9%. Cada aplicação consistiu em uma injeção contendo 1,0 mL das substâncias acima referidas, e este volume foi distribuído de forma igualitária no dorso, abdômen (6 aplicações subcutâneas) e coxa (1 aplicação intramuscular) dos animais. A imunização seguiu três etapas: na primeira utilizou-se Adjuvante de Freund Completo. Após 21 dias, realizou-se a segunda aplicação com Adjuvante de Freund Incompleto. Passados mais 21 dias, a terceira aplicação foi realizada com salina. Em todas estas etapas foram utilizadas cerca de 50 µg/mL de proteína. Após 7 dias da última aplicação o sangue foi coletado mediante punção cardíaca, sendo mantido a 4°C, por 1 hora. O soro foi recolhido por decantação e utilizado para a purificação da fração de IgG produzida para poligalacturonase.

Primeiramente, o soro foi mantido a 56°C por 30 minutos. Após este período este foi precipitado por adição de sulfato de amônio saturado (metade do volume inicial de soro), deixado "overnight" a 4°C e centrifugado a 3000g por 10 min. O precipitado foi ressuspenso com sulfato de amônio 40% (p/v) (metade do volume inicial) e novamente centrifugado nas mesmas condições descritas acima. O precipitado foi então dissolvido em salina 0,9% (p/v) (metade do volume inicial) mais tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,5. Em seguida, foi dialisado por 2 dias contra tampão fosfato (3 trocas diárias do tampão) e aplicado em coluna DEAE-celulose (1,0 x 5,0 cm), equilibrada e eluída com o tampão fosfato descrito acima, onde as frações de IgG não interagiram com a resina. Estas frações foram dialisadas contra

água destilada, liofilizadas, ressuspensas em tampão PBS (composto de NaCl 0,8% (p/v), KCl 0,02% (p/v), Na₂HPO₄ 0,144% (p/v), pH 7,4) mais 0,1% (p/v) de BSA. Após estes procedimentos as amostras foram filtradas (filtro Nalgene 0,45 µm), e utilizadas para a quantificação por teste ELISA do anticorpo anti-poligalacturonase.

3.26.2 Teste ELISA (Enzyme-linked immusorbent assay)

Inicialmente, a amostra do antígeno foi quantificada pelo método de Lowry *et al.* (1951) e diluída em tampão carbonato/bicarbonato (Na₂CO₃ 15 mM e NaHCO₃ 35 mM em água Milli-Q), pH 7,4. A placa de poliestireno de Corning de alta afinidade foi sensibilizada com os antígenos diluídos (máximo de 30 ng/poço) durante uma noite a 4°C. A placa foi lavada 5 vezes com PBS mais Tween 20 0,05%, bloqueada com 200 µL/poço de tampão de bloqueio (BSA 1% (p/v) em PBS) por uma hora a 37°C, e novamente lavada.

A fração IgG do anticorpo formado contra poligalacturonase foi diluída seriadamente em log de 10 e log de 2 em tampão diluente (tampão de bloqueio mais Tween 20 0,05%, distribuída nos poços (100 µL/poço) excluindo-se o branco (poço 1) da reação, mantida a 4°C, durante uma noite. Após este período a placa foi novamente lavada, e adicionou-se 100 µL/poço da solução de anticorpos conjugados à peroxidase contra imunoglobulinas de coelhos diluída 1:1000 em tampão diluente por 1 hora, a 37°C. A placa foi novamente lavada como descrito anteriormente. Em seguida, adicionou-se 100 µL/poço da solução de substrato OPD (o-fenilenediamine dihydrochloride) composto de 10 mg do substrato para 10 mL de diluente de OPD (composto por 4,86 mL de ácido cítrico 2,1%, 5,14 mL de fosfato de sódio dibásico 7,16% e 30 µL de H₂O₂ p.a.). A placa foi coberta com papel alumínio e deixada a temperatura ambiente de 5 a 15 minutos. A reação enzimática

foi interrompida pela adição de 50 µL/poço de solução de ácido sulfúrico 16% (v/v) e a quantificação dos anticorpos realizada em leitor de ELISA com filtro 490 nm.

3.26.3 Western blotting da poligalacturonase purificada de *Paecilomyces variotii*

Para a realização do Western Blotting, a poligalacturonase purificada produzida por *Paecilomyces variotii* foi submetida a uma eletroforese em SDS-PAGE 8%. Após a corrida eletroforética as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas à reação imunológica contra anticorpos anti-PG.

A eletroforese foi realizada em temperatura ambiente durante 2 horas seguindo-se o processo de transferência para a membrana de nitrocelulose. O tampão utilizado para a transferência foi composto por Tris-HCl 20mM, glicina 192mM e metanol 20% (v/v). Este processo teve duração de 4 horas e meia, em voltagem constante (30V) a temperatura ambiente.

Para a transferência montou-se um sistema de “sanduíche” (placa do sistema, esponja, duas folhas de papel de filtro cortadas em tamanho adequado, gel, membrana, dois papéis de filtro, esponja e placa do sistema). Após a transferência, a membrana foi deixada à temperatura ambiente durante 30 minutos para secagem. O gel foi fixado e corado com uma solução de Comassie Brilliant Blue R-250 0,05%, 90,8mL metanol 50% e 9,2mL ácido acético glacial. Posteriormente, este foi lavado com uma solução “destain” (25mL de etanol, 8mL de ácido acético e 65mL de água destilada) para a retirada do excesso do corante. O procedimento seguinte foi a coloração da membrana contendo a proteína transferida.

A lavagem da membrana foi rapidamente realizada com tampão TTBS (Tris-HCl 0,01M, NaCl 0,9% (p/v), triton 0,1% (p/v) – pH 7,6) e, em seguida, foi imersa em solução bloqueadora (leite desnatado 5% (p/v) em tampão TTBS), mantida sob leve agitação, durante 1 hora. Novamente a membrana foi rapidamente lavada em tampão TTBS e incubada com o anticorpo anti-PG (1:1000 em TTBS) durante 16 horas. Após a incubação foram realizadas mais três lavagens consecutivas em tampão TTBS por 3, 3 e 4 minutos, e durante 6 horas, a membrana foi incubada com 100µL do anticorpo secundário (anti-coelho complexado com peroxidase) diluído em 10mL de solução bloqueadora. A função deste anticorpo foi ligar-se ao primeiro que é específico. Em seguida a membrana foi lavada mais três vezes em tampão TTBS por 3, 3 e 4 minutos.

A membrana foi incubada em 10mL de solução preparada com duas pastilhas do reagente I e duas pastilhas do reagente II em 10mL de água milli-Q. Cada pastilha do reagente I continha 0,7mg/mL de DAB (3,3'-diaminobenzidina peroxidase) em tampão Tris-HCl 0,06M e cada uma das pastilhas do reagente II continha 2mg/mL de H₂O₂. A membrana ficou imersa nesta solução até o aparecimento das bandas que representaram o complexo antígeno-anticorpo. A reação ocorreu no escuro e foi finalizada com excesso de água destilada. A transferência e coloração da membrana foram realizadas segundo metodologia descrita por TOWBIN *et al.* (1979).

3.27 Repetibilidade dos experimentos

Todos os dados foram obtidos a partir de experimentos realizados em triplicata.

4. RESULTADOS

4.1 Seleção das linhagens produtoras de pectinases em fermentação líquida

Para a seleção das linhagens produtoras de pectinases, utilizou-se 20 fungos, sendo 15 deles coletados conforme item 3.1 de Material e Métodos e 5 já existentes na micoteca do laboratório. Os mesmos foram incubados em meio Czapeck, tendo pectina a 1% como fonte de carbono, em pH 7,0, por 72 horas a 35°C, sob agitação (100 rpm). Para a escolha ponderou-se os valores de atividade enzimática (U/mL), atividade específica (U/mg), ausência de publicações sobre o tema abordado e o fungo a ser estudado.

Os resultados (**Tabela 1**) demonstraram que nem todas as linhagens isoladas produziram a enzima de interesse em quantidades consideráveis. A presença de pectina como única fonte de carbono, nos permitiu observar que os fungos que apresentavam maior crescimento (dados não reportados), demonstraram também maior produção de poligalacturonase extracelular, uma vez que a molécula de pectina, por apresentar alta massa molecular, não atinge níveis intracelulares.

As linhagens denominadas 10 e 14 e as linhagens já identificadas *Paecilomyces variotii* e *Penicillium herquei*, foram as que resultaram na produção de poligalacturonase com maiores atividades específicas sob as condições já descritas. O objetivo desse experimento foi selecionar a melhor cepa produtora de pectinases para dar seqüência aos experimentos, para isso, selecionou-se o fungo *Paecilomyces variotii*, tendo em vista que o mesmo além de apresentar excelente potencial para produção de poligalacturonase, também já se encontrava identificado. Ressalta-se que não consta na literatura dados referentes à produção de pectinases por esse microrganismo.

Tabela 1: Seleção das linhagens produtoras de pectinases em fermentação líquida.

Fungos	Atividade Extracelular (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
1	0,89	0,59	1,51
2	2,13	0,32	6,68
5	0,30	0,38	0,77
6	0,85	0,67	1,28
7	0,81	0,29	2,74
8	1,27	0,30	4,18
9	0,90	0,29	3,12
10	3,62	0,36	10,14
11	0,82	0,29	2,89
13	0,84	0,38	2,22
14	3,69	0,36	10,14
15	1,16	0,32	3,56
16	0,30	0,29	1,03
17	1,76	0,53	3,32
18	1,16	0,52	2,24
<i>Paecilomyces variotii</i>	6,04	0,37	16,14
<i>Aspergillus niveus</i>	1,86	0,51	3,62
<i>Aspergillus caespitosus</i>	1,44	0,42	3,44
<i>Rhizopus microsporus</i>	2,45	0,35	7,10
<i>Penicillium herquei</i>	4,62	0,40	11,74

Fungos cultivados em meio Czapeck com pectina 1%, pH 7,0, 72 horas, 35°C, sob agitação (100 rpm).

4.2 Tempo de reação enzimática

O objetivo deste experimento foi determinar o tempo ótimo de reação enzimática, ou seja, a maior relação entre formação de produto e tempo. Para isso,

todos os parâmetros (pH, temperatura, tampão e quantidade de enzima e substrato) foram mantidos constantes, sendo que apenas o tempo foi variante.

A **Figura 3** mostra que com cinco minutos de reação, a relação entre quantidade de produto formado e tempo é a maior, e que quanto maior o tempo de reação, menor é essa relação. Por isso, determinou-se cinco minutos como o tempo ótimo para a reação enzimática. Todos os ensaios foram feitos em triplicata, nestes tempos.

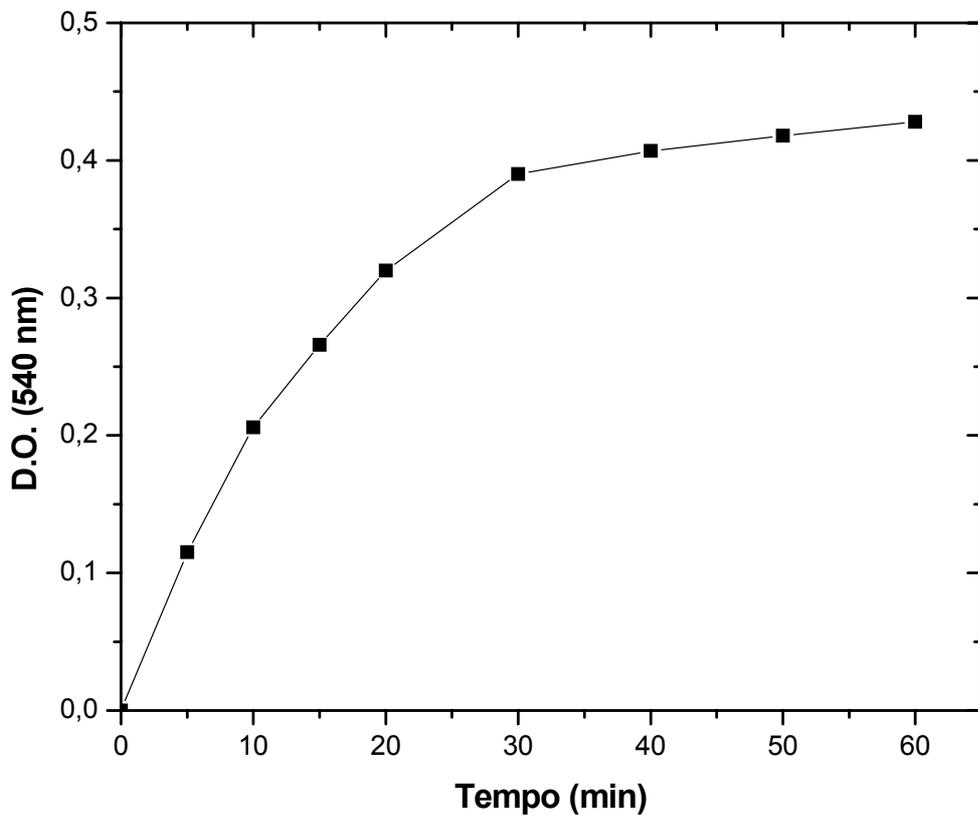


Figura 3: Padronização do tempo de hidrólise do substrato pelo extrato bruto.

4.3 Avaliação de meios de cultivo para produção de poligalacturonase

Uma vez definido o melhor fungo produtor de poligalacturonase, esporos de *Paecilomyces variotii* foram inoculados em cinco meios de cultivos diferentes com o objetivo de selecionar a melhor composição indutora da produção de enzimas pectinolíticas. Os meios de cultivo testados foram Czapeck, Khanna, SR, Vogel e Adams, sendo estes suplementados com pectina cítrica Sigma a 1% e incubados a 35°C, sob agitação orbital a 100 rpm, por 72 horas.

Os inóculos consistiam de um 1,0 mL de uma solução com $1,7 \times 10^5$ esporos por mL, em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio. A **Tabela 2** representa os resultados obtidos neste experimento.

Vários parâmetros foram avaliados para determinar o melhor meio de cultivo, destacando-se a atividade pectinolítica extra e intracelular, determinada através da reação com D.N.S, e o crescimento do microrganismo.

Quanto ao crescimento, todos os meios testados proporcionaram o desenvolvimento do microrganismo, demonstrando que o mesmo possui uma fácil e rápida adaptabilidade a diferentes condições. O meio Adams apresentou uma maior produção de poligalacturonase intracelular, o que não se torna vantajoso para enzimas com aplicação industrial. Os meios Vogel e Czapeck foram os melhores indutores da produção de poligalacturonase, no entanto em meio Czapeck, o fungo apresentou melhor crescimento e, além disso, a produção de poligalacturonase também foi maior somando-se as atividades intra e extracelulares. Concluindo, a composição do meio Czapeck foi definida como a melhor para o cultivo de *Paecilomyces variotii* tendo como objetivo a produção de poligalacturonase. Não houve produção de pectina liase e pectato liase em nenhum dos meios de cultivo testados.

Tabela 2: Avaliação de meios de cultivo para produção de poligalacturonase.

Meio	Atividade (U/mL)		Proteínas Extracelulares (mg/mL)	Atividade Espec. Extracelular (U/mg)	Crescimento (mg de proteína)
	Extra	Intra			
Czapeck	7,94	3,79	0,61	13,00	10,2
Khanna	3,08	3,93	1,85	1,66	13,2
SR	3,94	5,99	1,12	3,50	11,8
Vogel	9,87	0,56	0,52	18,90	7,02
Adams	1,26	8,65	0,52	2,41	9,56

Cultivo em diferentes meios de cultura, com pectina 1%, pH 7,0, 72 horas, 35°C, sob agitação (100 rpm).

4.4 Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de poligalacturonase

Buscando conseguir uma maior produção enzimática fez-se necessário estabelecer um perfil de secreção de enzima em função do tempo de cultivo, estabelecendo dessa forma, correlação entre o crescimento e obtenção enzimática (**Figura 4**).

Foi possível observar uma fase lag (adaptação) relativamente curta e também níveis significantes de poligalacturonase extracelular, por outro lado, não houve produção de pectina e pectato liase.

Sob agitação, tanto o máximo de crescimento quanto de produção enzimática ocorreu em 72 horas de cultivo. Em condições estacionárias o crescimento máximo do microrganismo ocorreu em 144 horas, já a atividade enzimática máxima ocorreu em 192 horas de cultivo. No entanto, a partir de 120 horas o aumento na produção de poligalacturonase foi menos expressivo. Com 120 horas de cultivo de forma estacionária a produção enzimática foi maior do que o máximo de produção sob agitação. Desta forma, pode-se concluir que o tempo de cultivo mais adequado para

a produção de poligalacturonase por *Paecilomyces variotii* foi de 120 horas de forma estacionária, tempo esse relativamente curto o que acarretaria um menor custo para produção em grande escala. Durante as 216 horas de incubação estacionária, ou 120 horas de incubação sob agitação, não se detectou a produção de pectina liase e pectato liase.

Uma vez determinado o perfil de produção de poligalacturonase intracelular, os demais experimentos darão ênfase às poligalacturonases que são secretadas para o meio extracelular, uma vez que essas enzimas podem ser estáveis tanto a temperatura quanto ao pH e apresentam um simples protocolo de extração, demonstrando, portanto, potencial para aplicação industrial.

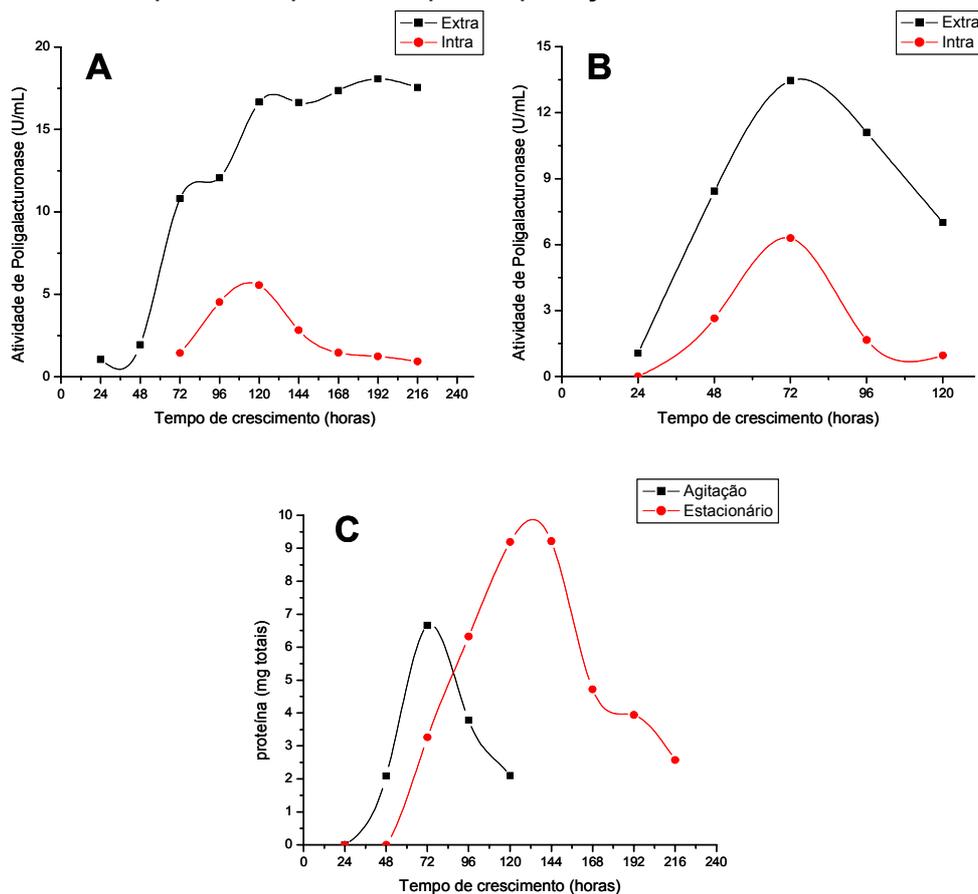


Figura 4 - Efeito do tempo de cultivo sobre a produção de poligalacturonase por *Paecilomyces variotii*. **(A)** Estacionário; **(B)** Agitação; **(C)** Crescimento. Microrganismo cultivado em meio Czapeck (pH 7,0), a 35°C.

4.5 Efeito da temperatura e pH na reação enzimática

A determinação da temperatura e pH de reação, em que a poligalacturonase produzida por este microrganismo apresentam maior atividade, foi realizada apenas para as amostras extracelulares.

Para o estudo do efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas, a solução enzimática bruta foi incubada junto ao substrato (polipectato de sódio 1%), em temperaturas que variaram de 30 a 80°C. A temperatura ótima é definida como sendo aquela em que se evidencia a maior atividade enzimática e, conseqüentemente, a maior formação de produto e consumo de substrato por unidade de tempo (**Figura 5A**). A atividade máxima ocorreu a 65°C, diminuindo gradativamente em temperaturas superiores ou inferiores a essa.

A influência do pH na atividade enzimática foi verificada em tampão McIlvaine, pH 3,0 a 8,0 variando em 0,5 unidade. O pH ótimo para a atividade da poligalacturonase no extrato bruto de *Paecilomyces variotii* foi 4,5 (**Figura 5B**).

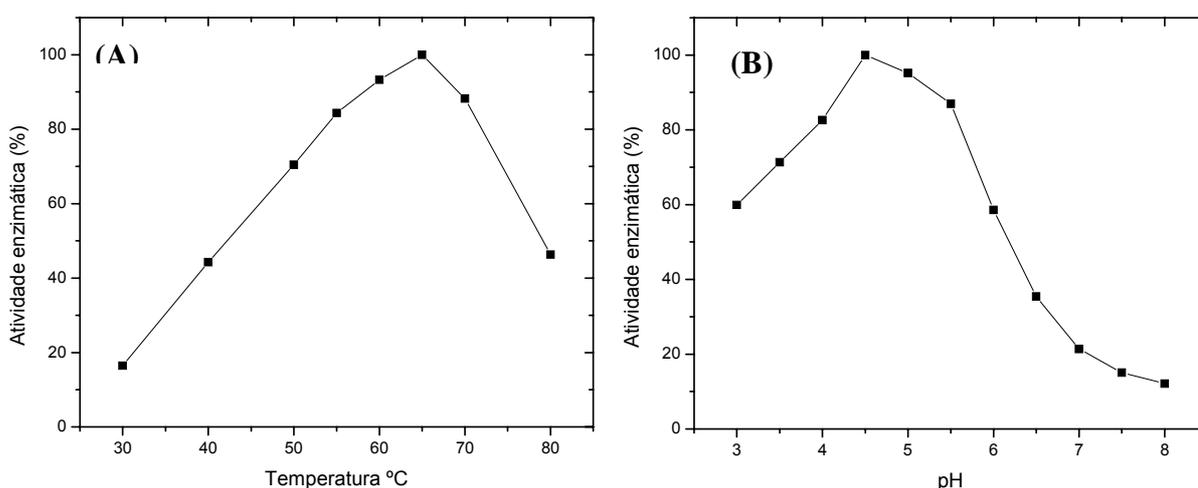


Figura 5: Determinação da temperatura e pH ótimos de reação. Atividade pectinolítica em função da temperatura de reação **(A)**; Atividade pectinolítica em função do pH de reação **(B)**.

4.6 Estabilidade à temperatura e ao pH da poligalacturonase extracelular

Para determinar a estabilidade da enzima frente a variações de pH, em ausência de substrato, o extrato enzimático foi incubado em tampão McIlvaine, pH 3,0 a 8,0 variando em 0,5 unidade, durante 24 horas (**Figura 6A**).

Nota-se que a enzima demonstrou estabilidade na faixa de pH 3,0 – 5,5, com uma atividade residual de cerca de 90% até pH 4,5. A partir disso a enzima manteve 50% de atividade até pH 5,5. Esses resultados são de relevância para um processo de aplicação industrial, uma vez que, essa enzima pode ser aplicada sobre uma ampla escala de pH, permanecendo ativa por um período relativamente longo.

Para o estudo do efeito de temperatura sobre a estabilidade da poligalacturonase, o extrato enzimático bruto foi mantido em temperaturas de 50 a 60°C, com intervalo de 5°C, em ausência de substrato por até 300 minutos (5 horas). Alíquotas foram retiradas em diferentes tempos para a dosagem das atividades residuais em pH e temperatura ótimos. Os resultados são mostrados na **Figura 6B**.

As enzimas mostraram-se altamente estáveis durante as cinco horas quando incubadas a 50°C, sendo que mantiveram mais de 80% de atividade. A 55°C mantiveram-se com até 80% de atividade depois de 15 minutos, retendo 50% de sua atividade depois de cinco horas. A estabilidade das enzimas a 60°C foi menor que aquela demonstrada a 55°C, onde se observou uma perda de 20% de atividade depois de 15 minutos e 50% depois de 30 minutos.

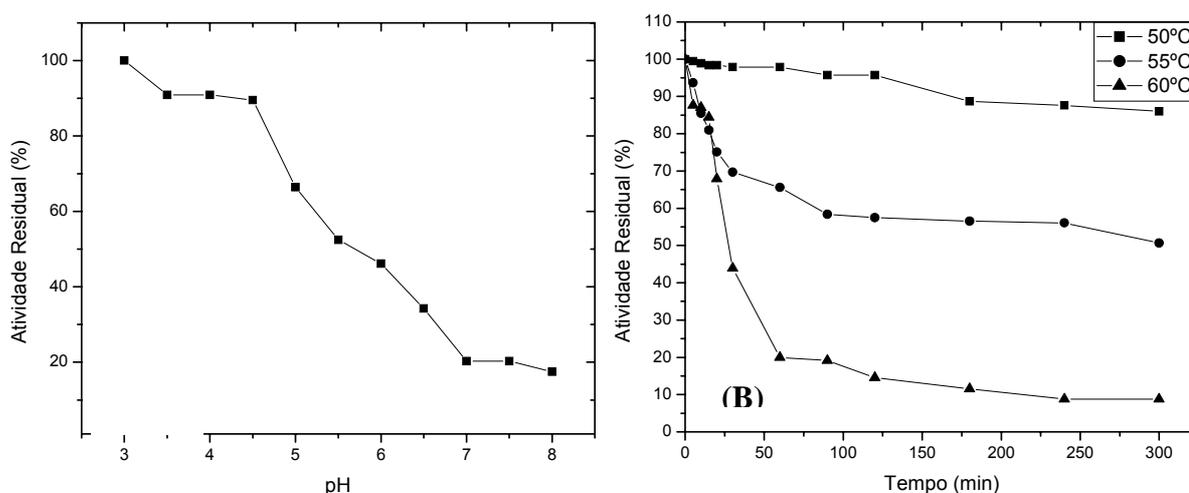


Figura 6: Estabilidade ao pH (A): o extrato bruto foi incubado nos pHs de 3,0 a 8,0 durante 24 horas. A seguir realizou-se o ensaio enzimático. Inativação térmica (B): extrato bruto incubado em diferentes temperaturas por até 300 minutos.

4.7 Efeito do pH inicial de meio de cultivo sobre a produção de poligalacturonase

Para o estudo do efeito do pH inicial do meio de cultivo sobre a produção de poligalacturonase, *Paecilomyces variotii* foi cultivado por 120 horas a 35°C em meio Czapeck, sendo que este teve seu pH inicial corrigido entre valores de 3,0 a 8,0 com intervalos de 1,0. A **Tabela 3** ilustra o crescimento e a produção enzimática nos diferentes valores de pHs iniciais.

Analisando-se os dados, pôde-se verificar que na faixa de pH de 4,0 a 7,0 o microrganismo se desenvolveu de forma similar. Apenas nos pHs extremos (3,0 e 8,0) o crescimento foi menor. Nos pHs de 4,0 a 7,0 o crescimento foi bastante semelhante o que mostra que os pHs próximos à neutralidade favorecem o crescimento do mesmo. Quanto à produção enzimática, foi possível observar que o fungo produziu quantidades significativas de poligalacturonase em todos os pHs

estudados, no entanto, em pH 7,0 a produção foi maior. Somando-se este resultado com o crescimento, já discutido, podemos enfatizar a versatilidade desse microrganismo em adaptar-se e também produzir poligalacturonase em diferentes condições, neste caso, uma ampla faixa de pH inicial.

Ainda com relação ao pH do meio, foi possível observar que após o término do processo fermentativo, os valores de pH foram superiores àqueles ajustados inicialmente. Com isso pode-se inferir que houve assimilação de ácidos orgânicos, juntamente com a hidrólise de algumas substâncias como uréia e proteínas, causando um aumento no pH do meio de cultivo.

Tabela 3: Efeito do pH do meio de cultivo para produção de poligalacturonase por *Paecilomyces variotii*.

pH inicial	pH final	Atividade extracelular (U/mL)		Proteínas extracelulares (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Crescimento (mg de proteína)
		Extra	Intra			
3,0	3,29	22,3	7,1	0,47	47,4	0,076
4,0	6,52	27,2	13,7	0,53	51,3	0,196
5,0	6,96	25,7	12,6	0,54	47,6	0,222
6,0	7,33	20,7	9,1	0,50	41,4	0,206
7,0	7,59	29,0	8,2	0,55	52,8	0,201
8,0	7,73	27,6	6,1	0,47	58,7	0,120

4.8 Efeito da temperatura de cultivo sobre a produção de poligalacturonase

Para o estudo do efeito da temperatura sobre a produção de poligalacturonase, conídios de *Paecilomyces variotii* foram inoculados em meio

Czapeck e mantidos em temperaturas que variaram de 25 a 50°C, em intervalos de 5°C e pH inicial 7,0.

Os resultados (**Tabela 4**) mostram que o microrganismo cresceu em temperaturas entre 25 e 40°C, porém a 45 e 50°C não houve crescimento. Foi possível observar ainda que a melhor temperatura para crescimento do fungo foi a 25°C.

O pico de atividade enzimática (U/mL) foi detectado em meio de cultivo a 30°C. Analisando-se a tabela abaixo pode-se observar que a 35°C a atividade específica foi maior, no entanto, a relação entre os valores de U/mL a 30°C e 35°C é exatamente a mesma entre os valores de U/mg, sendo assim, o parâmetro adotado para se determinar a temperatura ótima para produção de poligalacturonase foi o crescimento do microrganismo, que foi maior a 30°C. Assim, pode-se concluir que 30°C foi a temperatura adequada para a produção de poligalacturonase e, portanto, tomada para dar seqüência aos demais experimentos.

Tabela 4 - Efeito da temperatura de cultivo na produção de poligalacturonase por *Paecilomyces variotii*.

Temperatura °C	Atividade extracelular (U/mL)	Proteínas extracelulares (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Crescimento (mg de proteína)
25	15,1	0,48	31,5	2,95
30	19,9	0,53	37,5	1,08
35	17,4	0,43	40,5	0,78
40	13,6	0,50	27,2	0,86
45	5,4	0,52	10,4	Não houve crescimento
50	2,6	0,55	4,7	Não houve crescimento

4.9 Avaliação de diferentes fontes de carbono sobre a produção de poligalacturonase

Com o objetivo de avaliar a influência da fonte de carbono sobre a produção de poligalacturonase, foram realizadas dosagens enzimáticas nos extratos extracelulares provenientes de cultivos com diferentes fontes de carbono a 1%. A temperatura de incubação foi de 30°C e o pH inicial do meio foi 7,0, conforme definidos nos experimentos anteriores. Pectina Sigma® e meio de cultivo sem fonte de carbono foram tomados como controles e os resultados são mostrados na **Tabela 5**.

Entre as fontes de carbono testadas, pectina Sigma, pectina USP-B e pectina Vetec foram as que melhor induziram a produção de poligalacturonase, sendo estas superiores, em torno de 28, 25 e 23 vezes, comparada ao meio de cultivo sem fonte de carbono. Os demais tipos de pectinas testadas (8001, 7128 e JMH6) também resultaram em níveis significantes de produção de poligalacturonase. Com exceção de buriti, casca de maracujá, casca de laranja e casca de maçã, os vários resíduos testados não apresentaram bons níveis de produção enzimática. Esperava-se que estes fossem bons indutores, uma vez que são fontes complexas, com altos teores de íons e vitaminas, os quais são importantes para o crescimento do microrganismo.

Sabugo de milho, goma guar, palha de arroz e bagaço de cana não demonstraram níveis relevantes de indução da síntese de poligalacturonase, sendo 10, 8, 8 e 7,5 vezes menor que a indução por pectina Sigma®, respectivamente. O ácido monogalacturônico pode agir como um indutor ou um repressor da síntese de poligalacturonase, neste caso, demonstrou induzir a síntese enzimática em níveis próximos às diferentes pectinas.

Como já esperado, as fontes de carbono glicose, galactose e lactose não foram boas indutoras da produção de poligalacturonase, uma vez que são prontamente assimiladas como fonte de energia para o microrganismo.

4.10 Efeito da concentração da fonte de carbono na produção de poligalacturonase

Esta etapa do trabalho consistiu em avaliar qual a concentração de fonte de carbono mais adequada para a síntese de poligalacturonase (**Tabela 6**). Utilizou-se pectina Sigma como fonte de carbono, uma vez que foi a fonte que mais induziu a síntese enzimática. Os cultivos foram feitos nas condições ideais de pH inicial, tempo e temperatura, definidos anteriormente.

Pode-se observar um aumento de produção enzimática e crescimento, diretamente proporcional ao aumento da concentração da fonte de carbono. Em concentrações superiores a 1,25% foi possível observar um declínio na atividade enzimática. Além disso, não houve diferença significativa entre os valores de atividade enzimática obtidos com concentrações de fonte de carbono de 1,25 a 2,0%. Assim, ficou estabelecido que 1,25% seria a concentração ideal.

Tabela 5: Efeito da fonte de carbono na produção de poligalacturonase por *Paecilomyces variotii*.

Fonte de carbono (1%)	Atividade extracelular (U/mL)	Proteínas extracelulares (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Sem fonte	0,74	0,06	11,77
Pectina Sigma	20,87	0,22	96,22
Casca de maracujá	10,71	0,39	26,91
Casca de limão	4,21	0,63	6,73
Maracujá doce	4,39	0,33	13,35
Aveia	6,87	0,29	22,97
Goma Guar	2,54	0,16	15,95
Casca de laranja	12,76	0,68	18,89
Casca de maçã	13,99	0,56	25,11
Casca de buriti	8,48	1,62	5,24
Buriti	14,79	0,29	49,92
Tucumã	6,69	1,18	5,68
Bagaço de cana	2,79	0,38	7,38
Galactose	5,08	0,33	13,45
Milho moído	5,33	0,42	12,73
Sabugo de milho	1,98	0,46	4,34
Amido	3,78	0,33	11,48
Lactose	1,98	0,25	7,93
Palha de arroz	2,66	0,31	8,49
Glicose	4,15	0,31	13,56
Pectina 8001	10,09	0,54	18,68
Pectina Vetec	16,53	0,36	46,18
Pectina USP-B	18,70	0,39	48,35
Pectina 7128	17,28	0,42	41,26
Pectina JMH6	10,65	0,35	30,85
Ac. monogalacturônico	16,47	0,69	23,75
Polipectato de sódio	6,01	0,61	9,89

Tabela 6: Efeito da concentração da fonte de carbono (pectina Sigma) na produção de poligalacturonase por *Paecilomyces variotii*.

Fonte de carbono %	Atividade extracelular (U/mL)	Proteínas extracelulares (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Crescimento (mg de proteína)
0,00	0,49	0,022	22,90	0,01
0,25	3,53	0,036	99,31	0,01
0,50	7,93	0,93	213,71	0,01
0,75	13,68	1,04	327,99	0,32
1,0	16,66	1,27	326,64	0,39
1,25	21,55	1,43	376,88	0,76
1,50	20,00	1,51	331,87	0,80
1,75	19,88	1,51	329,81	0,97
2,0	19,38	1,55	313,55	2,07

4.11 Efeito da adição de glicose no meio de cultivo sobre a produção de poligalacturonase

Neste experimento, adicionou-se glicose ao meio de cultura, em concentrações crescentes (0 a 2%), junto com a fonte de carbono (pectina 1%), para verificar qual o efeito da glicose sobre a produção de poligalacturonase deste microrganismo. Inoculou-se também o fungo em um meio somente com glicose 2% (sem pectina, para controle).

A **Tabela 7** demonstra que o crescimento de *Paecilomyces variotii* foi 3,7 vezes maior com glicose 2% do que com pectina 1%. Em relação à síntese enzimática, conforme houve aumento nas concentrações de glicose, observou-se um aumento discreto na produção de poligalacturonase nas concentrações de glicose de 0,1 a 1%, havendo uma pequena diminuição na produção enzimática quando pectina foi combinada com 2% de glicose.

Tabela 7: Efeito da adição de glicose no meio de cultivo sobre a produção de poligalacturonase por *Paecilomyces variotii*.

Fonte de carbono	Atividade (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Crescimento (mg de proteína)	Ativ. Relativa (%)
P 1%	15,73	0,41	38,85	0,58	100
P + G 0,1%	20,19	0,47	43,00	0,61	128,3
P + G 0,25%	20,37	0,54	37,55	0,64	129,5
P + G 0,5%	21,98	0,55	39,69	0,95	139,8
P + G 1%	23,96	0,59	40,21	1,56	152,4
P + G 2%	20,56	0,78	26,49	2,16	130,7
G 2%	11,39	0,59	19,12	2,14	72,4

P= pectina G= glicose

4.12 Efeito da concentração osmótica na produção e atividade de poligalacturonase

Neste experimento, foram adicionadas várias concentrações de cloreto de sódio (NaCl) ao meio de cultura para verificar se o aumento da concentração osmótica no meio aumentaria a produção ou secreção de poligalacturonase, e se interferiria no desenvolvimento do microrganismo.

Como mostra a **Tabela 8**, verificou-se que os parâmetros crescimento e concentração de NaCl são inversamente proporcionais, ou seja, o aumento na concentração osmótica afeta negativamente o desenvolvimento do microrganismo, no entanto, a adição deste sal ao meio de cultura favoreceu o aumento da atividade de poligalacturonase em média de 1,86 vezes, sendo que com 0,25% de NaCl este aumento foi de 2,53 vezes, tomando-se como controle a ausência de NaCl no meio. Vale destacar que o NaCl não faz parte da composição original do meio Czapeck.

Tabela 8: Efeito da concentração osmótica na produção e atividade de poligalacturonase por *Paecilomyces variotii*.

NaCl %	Atividade (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Crescimento (mg de proteína)
0,00	7,37	0,27	0,87
0,25	18,64	0,36	0,72
0,50	10,89	0,33	0,64
0,75	11,02	0,36	0,58
1,00	13,81	0,38	0,58
1,25	14,06	0,39	0,53
1,50	14,06	0,38	0,50
1,75	11,52	0,47	0,41
2,00	14,79	0,42	0,41
2,25	13,62	0,30	0,38
2,50	14,79	0,32	0,17

4.13 Teste de aplicabilidade do extrato bruto em fibras alimentares

Visando analisar a versatilidade das enzimas presentes no extrato bruto obtido pelo cultivo de *Paecilomyces variotii* em meio Czapeck suplementado com pectina, em degradar alguns resíduos agroindustriais, o substrato (polipectato de sódio 1%) da reação enzimática foi substituído por: farinha de mandioca, trigo, flocos de aveia, flocos de soja, flocos de cevada, farinha de milho, centeio e casca de maracujá, analisando desta maneira, a quantidade final de açúcar redutor formado após 60 minutos de reação (**Tabela 9**). A reação foi realizada com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,0 e a 60°C.

Para tanto, fez-se necessário verificar a presença de outras enzimas que possivelmente foram induzidas e exportadas para o extrato bruto final (**Tabela 10**). Verificou-se ausência de ligninases, mas traços de invertase, xilanase e amilase.

4.14 Efeito da adição de ácido monogalacturônico no meio de cultivo sobre a produção de poligalacturonase

Neste experimento, adicionou-se ácido monogalacturônico (AMG) ao meio de cultura, em concentrações crescentes (0,1 a 2%), para verificar qual o efeito do mesmo sobre a produção de poligalacturonase deste microrganismo, visto que este monossacarídeo é o produto final da ação enzimática de uma exopoligalacturonase. Inoculou-se também o fungo em um meio somente com pectina 1% (para controle).

Os dados da **Tabela 11** mostram que o crescimento de *Paecilomyces variotii* foi 3,6 vezes maior com AMG 2% do que com pectina 1%. Em relação à secreção enzimática, observou-se um aumento significativo de poligalacturonase extracelular quando o meio continha maior quantidade de AMG. Outro dado importante é a produção intracelular de poligalacturonase. Os níveis intracelulares foram quase 4 vezes maiores quando o meio continha 1,5% de AMG do que com 1% de pectina. Isto se deve provavelmente a uma maior acessibilidade citosólica deste monômero, atuando como um verdadeiro indutor para poligalacturonase.

Tabela 9: Teste de aplicabilidade do extrato bruto em fibras alimentares.

Resíduos (1%)	µmols de açúcar redutor após 60 min
Farinha de mandioca	368,4
Flocos de aveia	295,4
Farinha de milho	184,6
Centeio	178,3
Flocos de cevada	159,8
Farelo de Trigo	127,0
Casca de maracujá	78,6
Flocos de soja	71,2
Polipectato de sódio	228,0

Tabela 10: Enzimas induzidas e exportadas para o extrato bruto.

Enzimas	U/mL
Amilase	4,6
Invertase	5,20
Xilanase	1,25
Poligalacturonase	24,6
Manganês-peroxidase	Não detectado
Lignina-peroxidase	Não detectado
Lacase	Não detectado

Tabela 11: Efeito da adição de ácido monogalacturônico no meio de cultivo sobre a produção de poligalacturonase por *Paecilomyces variotii*.

Fonte de carbono (%)	Atividade extracelular (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Crescimento (peso úmido em g)	Atividade intracelular (U/mL)
AMG 0,10	4,8	0,05	95,9	0,03	0,0
AMG 0,25	5,6	0,09	56,7	0,05	0,0
AMG 0,50	13,2	0,09	141,5	0,17	1,7
AMG 0,75	17,6	0,11	157,8	0,26	3,5
AMG 1,00	26,4	0,12	212,3	0,36	5,4
AMG 1,25	26,4	0,09	283,0	0,50	6,7
AMG 1,50	27,8	0,12	239,7	0,40	9,8
AMG 1,75	27,6	0,10	266,1	0,34	7,0
AMG 2,00	27,4	0,09	293,7	0,29	6,3
P 1,00	23,2	0,11	211,0	0,08	2,6

4.15 Produção de pectinases em meio substrato sólido

Fazendo-se referência ao estudo da melhor fonte de carbono indutora da produção de pectinases em cultura submersa, selecionou-se as 5 melhores fontes para realizar um cultivo em meio substrato sólido.

A produção de pectinases em meio substrato sólido por *Paecilomyces variotii* foi monitorada através das dosagens de atividade poligalacturonásica e do complexo pectinolítico como um todo. Esta escolha se deve ao fato de que, por um lado, THIBAULT (1983) afirma ser a poligalacturonase a enzima mais importante do ponto de vista da aplicação industrial, mas, por outro lado, FOGARTY & WARD (1974) ressaltam a importância da ação conjunta das diversas enzimas do complexo pectinolítico nos processos de extração, clarificação e concentração de sucos e vinhos, devido à contribuição de cada uma delas nas reações de degradação e/ou conversão aí envolvidas.

O dados da **Tabela 12** mostram que em comparação à cultura submersa, a indução da produção de poligalacturonase foi menor, além disso, a quantidade de proteínas extracelulares é maior, diminuindo os valores de atividade específica e, conseqüentemente, dificultando as etapas de purificação. Assim como em culturas submersas não foi detectada a presença de liases como pectina e pectato liase.

Tabela 12: Produção de poligalacturonase em meio substrato sólido.

Fonte de Carbono (1%)	Atividade extracelular (U/mL)	Proteína extracelular (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Casca de maracujá	5,08	0,82	6,20
Casca de laranja	4,89	1,18	4,14
Buriti	11,89	0,41	29,02
Casca de buriti	6,13	0,56	11,05
Casca de maçã	0,00	0,65	0,00

O fungo foi cultivado por 120 horas, a 35°C.

4.16 Purificação da poligalacturonase extracelular em colunas cromatográficas

Para estudar uma proteína em qualquer um de seus muitos detalhes é preciso, inicialmente, separá-la de todas as outras proteínas que estão presentes no meio de cultivo. Uma preparação pura de uma dada proteína é essencial para a determinação de suas propriedades bioquímicas, a composição e a seqüência dos seus aminoácidos.

Multiplicidade de métodos e procedimentos técnicos têm sido reportados para o isolamento e purificação de proteínas. Estes se baseiam em propriedades físico-químicas peculiares à constituição protéica. Os métodos podem ser fundamentados em: (i) solubilidade, (ii) processos não-específicos de adsorção em suportes inorgânicos, (iii) carga elétrica (cromatografia de troca iônica, eletroforese), e (iv) tamanho molecular (cromatografia em gel permeável). Estes

métodos são referidos como “métodos clássicos”, em oposição àqueles baseados em interações mais específicas.

Portanto, tendo padronizado as condições de cultivo em meio Czapeck utilizando-se pectina Sigma® como fonte de carbono, uma poligalacturonase foi purificada através de dois procedimentos cromatográficos: DEAE-Fractogel previamente equilibrada e eluída em tampão Tris-HCl 10mM, pH 7,5 e em coluna cromatográfica de filtração Sephadex G-100 equilibrada e eluída em tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,0.

4.16.1 Purificação da poligalacturonase

O filtrado da cultura de *P. variotii* crescido em meio Czapeck foi separado do micélio, centrifugado a 18000 g, 4°C, por 10 minutos para precipitar a pectina residual presente no meio, dialisado por 12 horas contra tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 e aplicado em coluna de troca iônica DEAE-Fractogel.

Esta etapa de purificação resultou em apenas um pico de atividade que interagiu com a resina, e foi eluído com aproximadamente 217 mM de NaCl (**Figura 7**). As frações foram reunidas, o “pool” dialisado contra água destilada, liofilizado, ressuspenso em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,0 e aplicado em coluna de filtração Sephadex G-100 (**Figura 8**). A amostra apresentou um pico de atividade poligalacturonásica. Este foi reunido, dialisado contra água destilada por 12 horas, a 4°C e concentrado por liofilização. O liofilizado foi então ressuspenso em água milli-Q e utilizado como amostra para eletroforeses.

Estes processos resultaram em uma poligalacturonase extracelular com alto grau de pureza, com 47,2% de recuperação e um fator de purificação de 10,1 vezes (**Tabela 13**), sendo utilizada em experimentos de caracterização bioquímica.

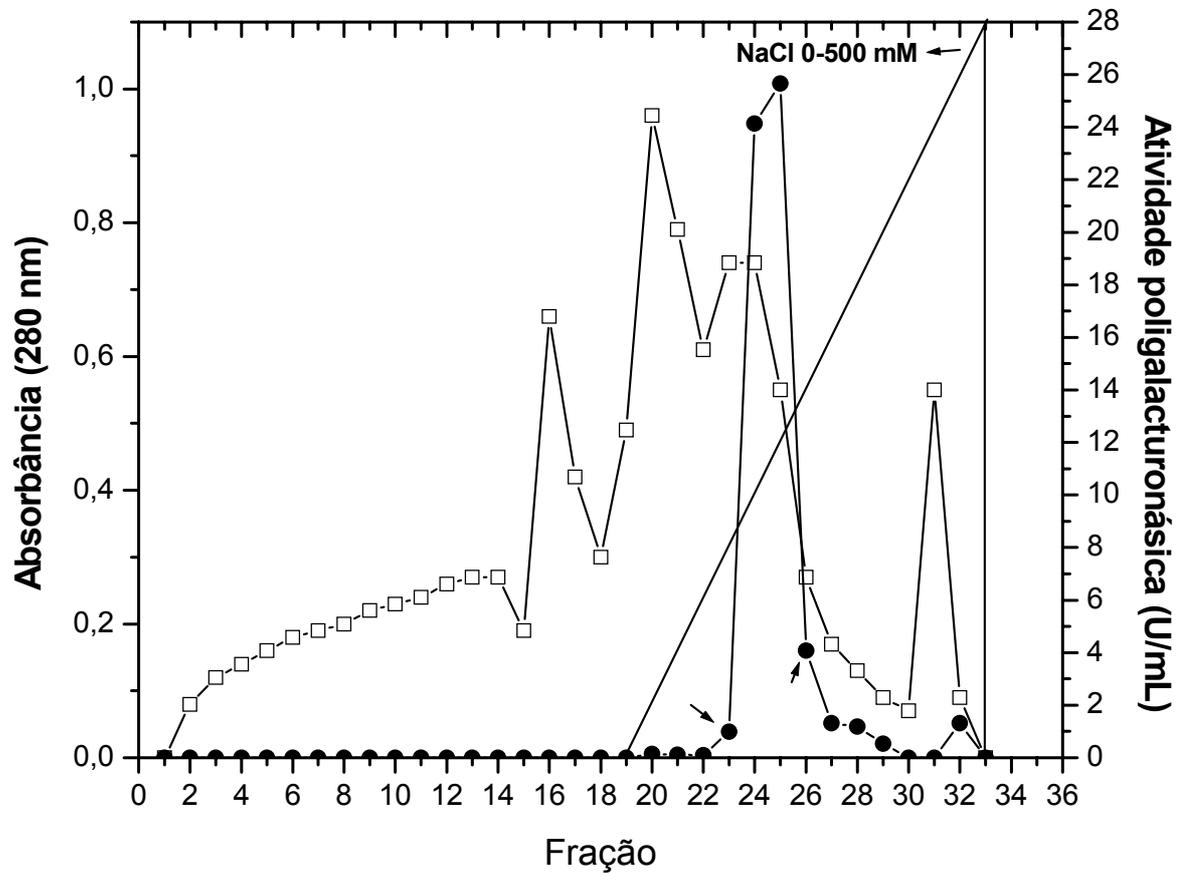


Figura 7: Perfil cromatográfico em DEAE-Fractogel da atividade poligalacturonásica produzida por *Paecilomyces variotii*. Símbolos: (●) atividade poligalacturonásica; (□) absorbância a 280 nm. A atividade enzimática foi estimada através da quantificação de açúcares redutores (DNS) tendo polipectato de sódio 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 100mM, pH 4,0 como substrato.

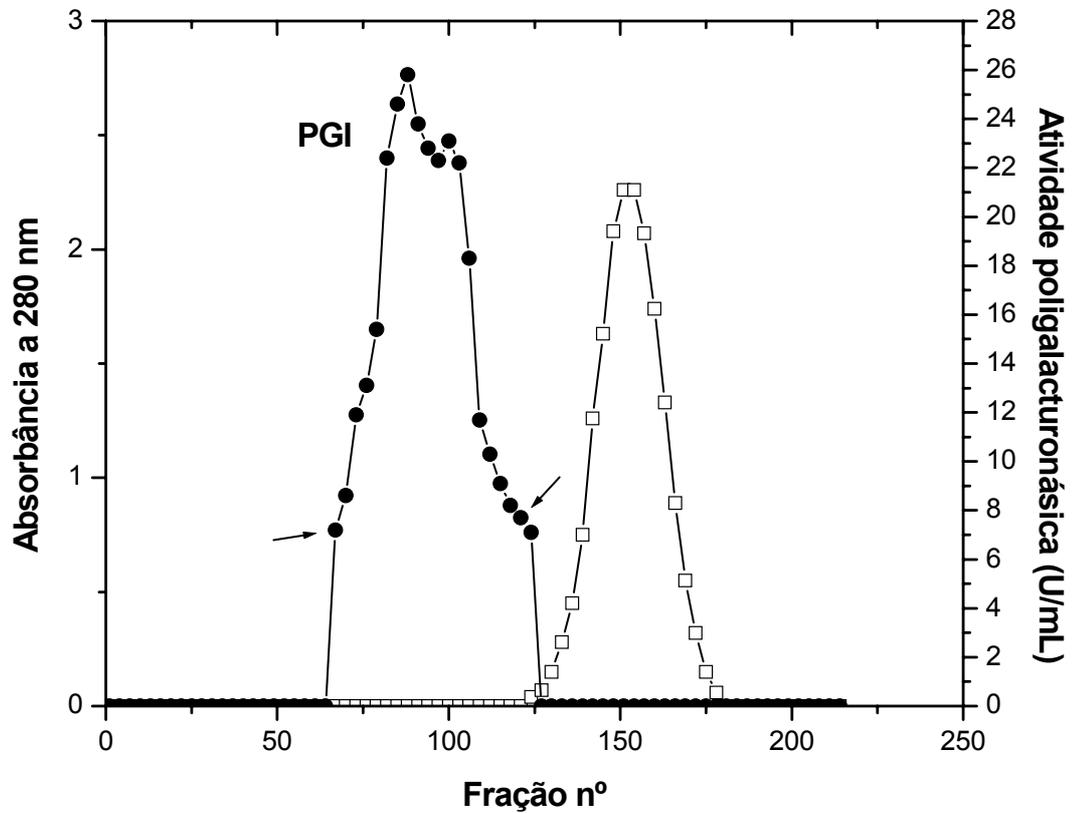


Figura 8: Perfil cromatográfico em Sephadex G-100 da atividade poligalacturonásica produzida por *Paecilomyces variotii*. Símbolos: (●) atividade poligalacturonásica; (□) absorbância a 280 nm. A atividade enzimática foi estimada através da quantificação de açúcares redutores (DNS) tendo polipectato de sódio 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 4,0 como substrato.

Tabela 13: Etapas de purificação da poligalacturonase extracelular produzida pelo fungo *Paecilomyces variotii*.

Passos	Vol (mL)	Proteína	Ativ.	Ativ.	% Recuperação	Fator de Purificação
		Total (mg)	Total U Totais	espec. U/mg		
Extrato bruto	140	48,9	1453,2	29,7	100	1
DEAE- Fractogel	40	9,9	741,4	74,8	51,0	2,52
Sephadex G100	40	2,3	686,5	298,5	47,2	10,1

U = Unidades

U/mg prot. = Unidades / miligrama de proteína

4.17 Critério de pureza

O critério de pureza empregado foi à análise eletroforética da enzima em gel de poli-acrilamida em condições não desnaturantes. Conforme pode-se observar na **Figura 9A**, a poligalacturonase (eluída em Sephadex G-100) exibe uma única banda protéica após o gel ter sido corado por prata (BLUM *et al.*, 1987). A **Figura 9B** ilustra a atividade poligalacturonásica em PAGE incubado com uma solução de polipectato de sódio a 1% em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,0, em banho-maria a 60°C por 15 minutos. A coloração foi realizada com vermelho de rutênio.

4.18 Determinação da massa molecular

A massa molecular da poligalacturonase foi determinada em gel de poli-acrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrito no item 3.15 de Material e Métodos. A enzima produzida por *Paecilomyces variotii* apresentou massa molecular de 79,4 kDa (**Figura 10**). Este dado foi obtido quando extrapolado na representação gráfica ilustrada na **Figura 11**.

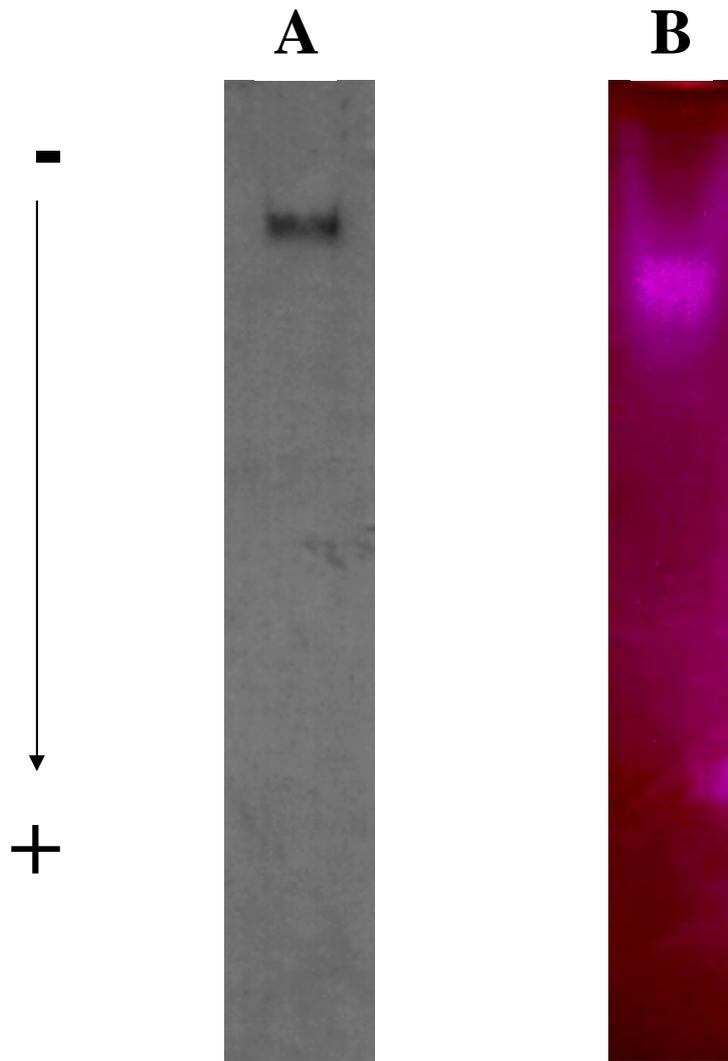


Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE 12%) da poligalacturonase. Gel corado com nitrato de prata (**A**); gel incubado com polipectato de sódio e corado com vermelho de rutênio para a atividade poligalacturonásica (**B**).

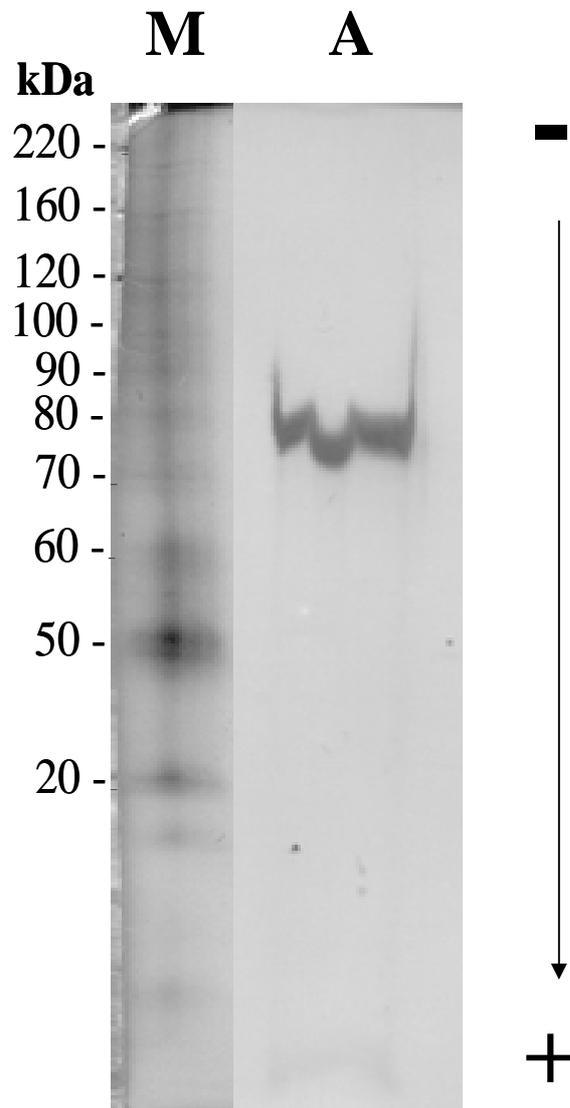


Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE 8%) da poligalacturonase. Gel corado com prata para os marcadores (M); poligalacturonase (A).

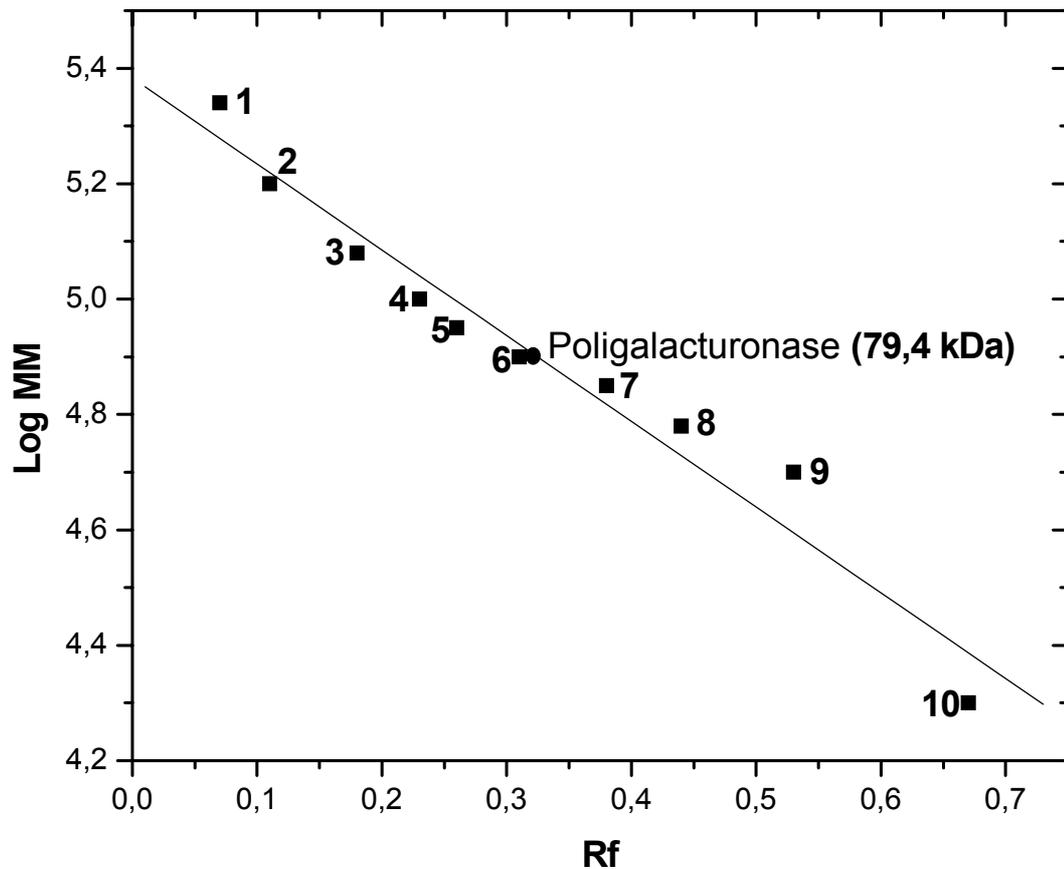


Figura 11: Determinação da massa molecular (MM) da poligalacturonase de *Paecilomyces variotii* por eletroforese em gel de poliácridamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE 8%). Proteínas padrões: (1) 220 kDa; (2) 160 kDa; (3) 120 kDa; (4) 100 kDa; (5) 90 kDa; (6) 80 kDa; (7) 70 kDa; (8) 60 kDa; (9) 50 kDa; (10) 20 kDa.

4.19 Determinação da massa molecular por cromatografia de filtração em gel

Outro procedimento utilizado na determinação da massa molecular da poligalacturonase foi a aplicação da enzima purificada em coluna de filtração. Utilizou-se para este procedimento, a coluna de filtração Bio-sil SEC-400 da Bio-Rad, onde a amostra aplicada apresentou um único pico de atividade pectinolítica. Através de uma reta padrão, estimou-se que a massa molecular da enzima em

questão foi de 77,3 kDa (**Figura 12**). Com este resultado pode-se concluir que esta poligalacturonase trata-se de uma enzima monomérica, ou seja, com apenas uma subunidade.

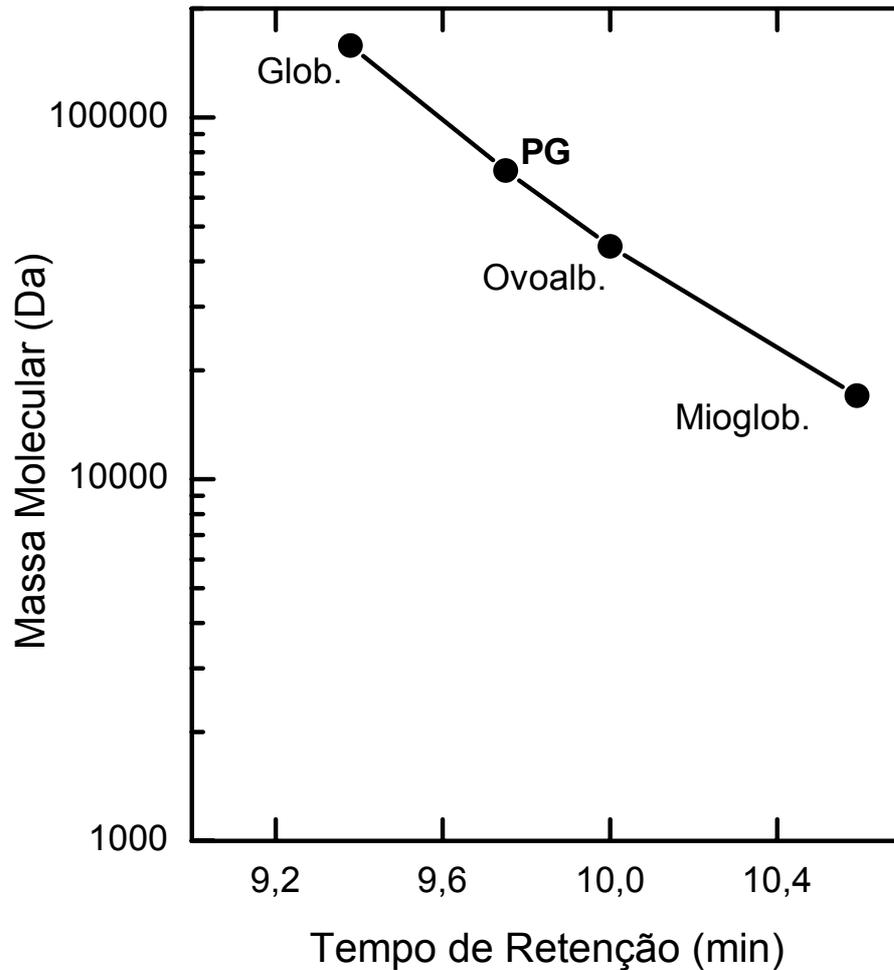


Figura 12: Determinação da massa molecular da poligalacturonase extracelular de *Paecilomyces variotii* em HPLC. A cromatografia foi realizada em HPLC equipado com uma coluna de Bio-sil SEC-400 equilibrada e eluída em tampão Hepes 100 mM, pH 6,8, contendo 150 mM de NaCl e azida 10 mM sob o fluxo de 1,0 ml/min. Símbolos: Globulina (158 kDa); Ovalbumina (45 kDa); Mioglobina (17 kDa).

4.20 Cromatografia em camada delgada de sílica do produto de hidrólise da enzima purificada

A cromatografia dos produtos de hidrólise além de fornecer maiores informações a respeito da especificidade, constitui-se em um importante critério para se determinar a classificação enzimática quanto ao seu modo de ação sobre o substrato (**Figura 13**).

Pode-se observar claramente que quanto maior o tempo de reação, maior a formação de monômeros (ácido monogalacturônico). A rápida formação de ácido monogalacturônico caracteriza uma exopoligalacturonase (poli (1,4- α -D-galacturonídeo) galacturonohidrolase, EC 3.2.1.67), que catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 na extremidade não redutora da cadeia do pectato de sódio.

4.21 Determinação do conteúdo de carboidratos

Através do método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) foi verificada a natureza glicoprotéica da poligalacturonase purificada de *Paecilomyces variotii*. O conteúdo de carboidratos foi estimado em 27,5%.

4.22 Determinação do ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico da enzima purificada foi determinado após focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida, utilizando anfólitos Pharmalite com pH de 2,0 a 5,0. Com este procedimento, obteve-se o valor de 4,37 como sendo o pI desta enzima (**Figura 14**). Isto significa que neste pH, esta poligalacturonase apresenta carga elétrica líquida igual a zero.

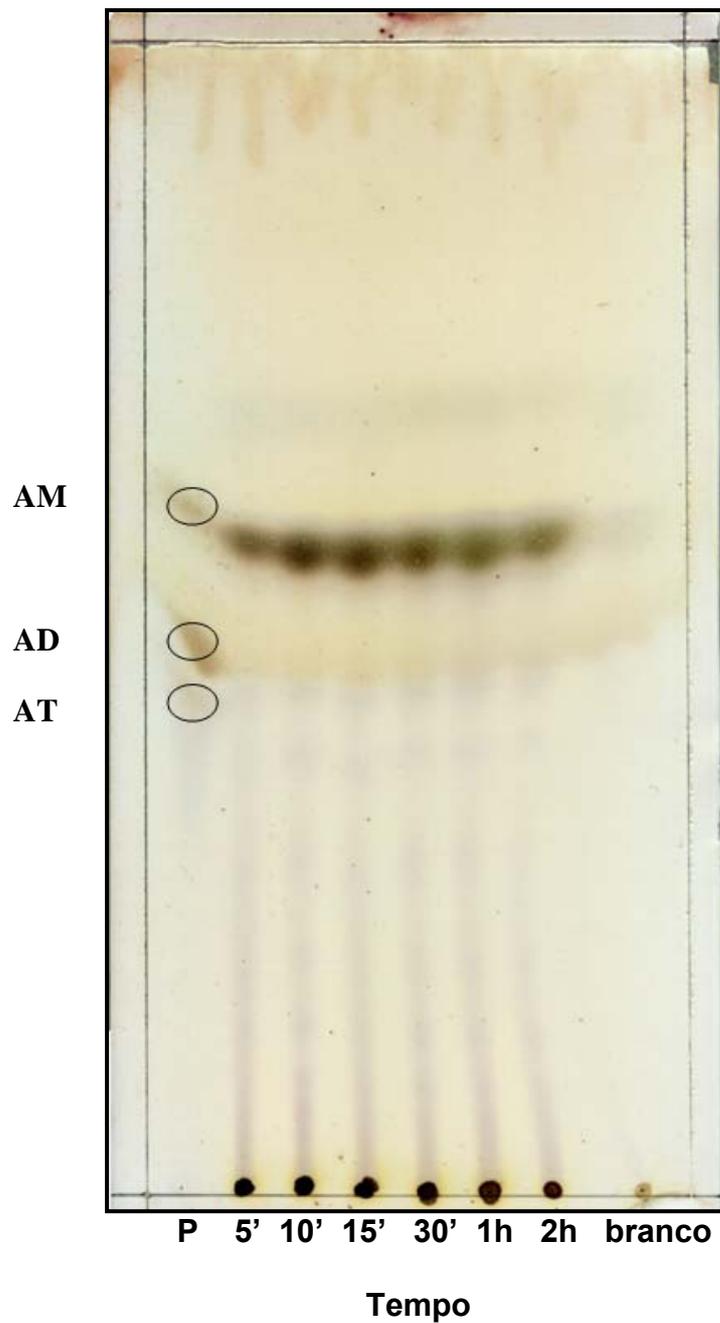


Figura 13: Cromatografia em camada delgada de sílica do produto de hidrólise da ação da poligalacturonase. P = padrão: mistura de ácido monogalacturônico (AM), ácido digalacturônico (AD) e ácido trigalacturônico (AT) (todos a 1% (p/v)); 5', 10', 15' e 30' representam os produtos de hidrólise após 5, 10, 15 e 30 minutos de reação, respectivamente; 1h e 2h representam os produtos de hidrólise após 1 e 2 horas de reação, respectivamente; branco: representa o tempo zero da reação. Em todos os casos foram aplicados 10 μ L de amostra.

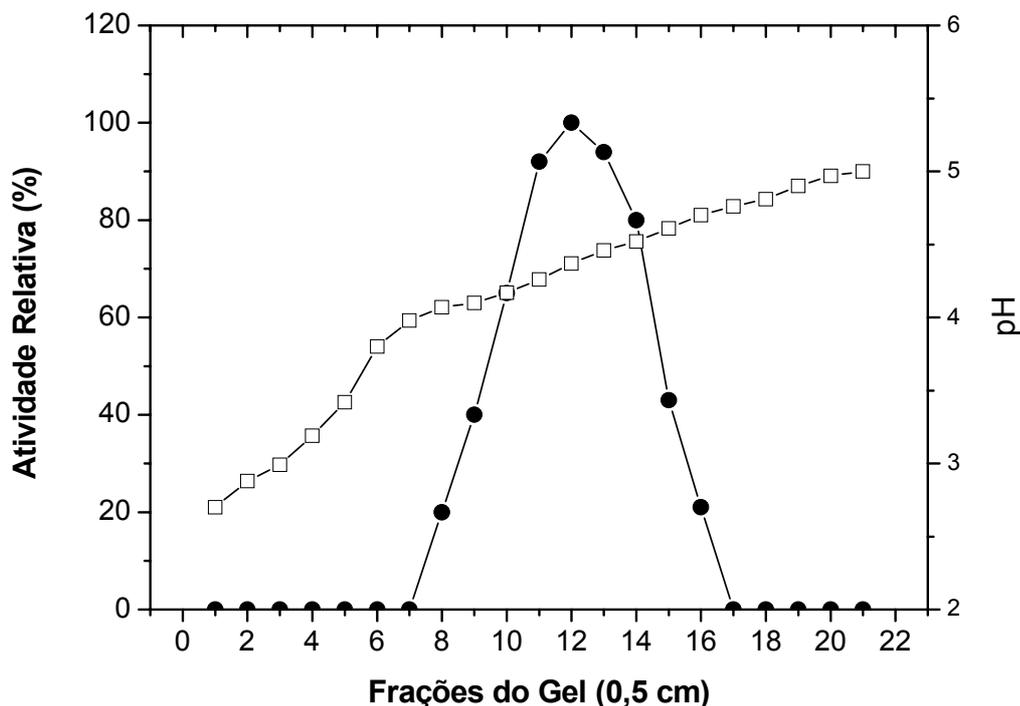


Figura 14: Representação gráfica da focalização isoeletrica da poligalacturonase produzida por *Paecilomyces variotii*. Símbolos: (□) gradiente de pH formado no gel; (●) atividade enzimática determinada nos fragmentos do gel, pelo método de MILLER (1959).

4.23 Hidrólise de diferentes substratos pela poligalacturonase purificada

Neste experimento o objetivo foi avaliar a capacidade da poligalacturonase purificada de *Paecilomyces variotii* em degradar diferentes tipos de possíveis substratos. Para isto, utilizou-se pectinas com diferentes níveis de metoxilação, dissacarídeos e polissacarídeos, na concentração de 1 mg/mL (**Tabela 14**). Com exceção de trealose (ligações α -1,1-glicosídicas) e xilana (ligações β -1,4-glicosídicas) os demais substratos possuem ligações α -1,4-glicosídicas. Apenas os diferentes tipos de pectinas testados mostraram-se adequadas para acessar o sítio

catalítico desta enzima. Neste caso, o fator determinante foi o grau de metoxilação destas moléculas.

Tabela 14: Especificidade ao substrato da poligalacturonase purificada de *Paecilomyces variotii*.

Substratos	$\mu\text{mol de produto / min / mL}$	%
Polipectato de sódio	21,24	100
Pectina Sigma (GM*=9%)	14,37	67,6
Pectina 8003 (GM=30%)	12,38	58,3
Pectina 8001 (GM=30%)	10,65	50,1
Pectina 7128 (GM=70%)	9,10	42,9
Pectina JMH6 (GM=70%)	7,06	33,2
Xilana	0,00	0,00
Amido	0,00	0,00
Glicogênio	0,00	0,0
Trealose	0,00	0,0
Sacarose	0,00	0,0

* GM= grau de metoxilação (média)

4.24 Análises cinéticas da poligalacturonase

Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados conforme procedimento descrito por HANES (1932). Através dos valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ pode-se calcular a eficiência catalítica da poligalacturonase frente ao substrato (CRANE & SOLS, 1953). As atividades enzimáticas foram determinadas em condições ótimas de pH e temperatura. Na **Figura 15** está ilustrada a representação de Hanes da poligalacturonase. Na **Tabela 15** observa-se os valores de K_m aparente, $V_{m\acute{a}x}$ e eficiência catalítica da poligalacturonase frente ao substrato polipectato de sódio.

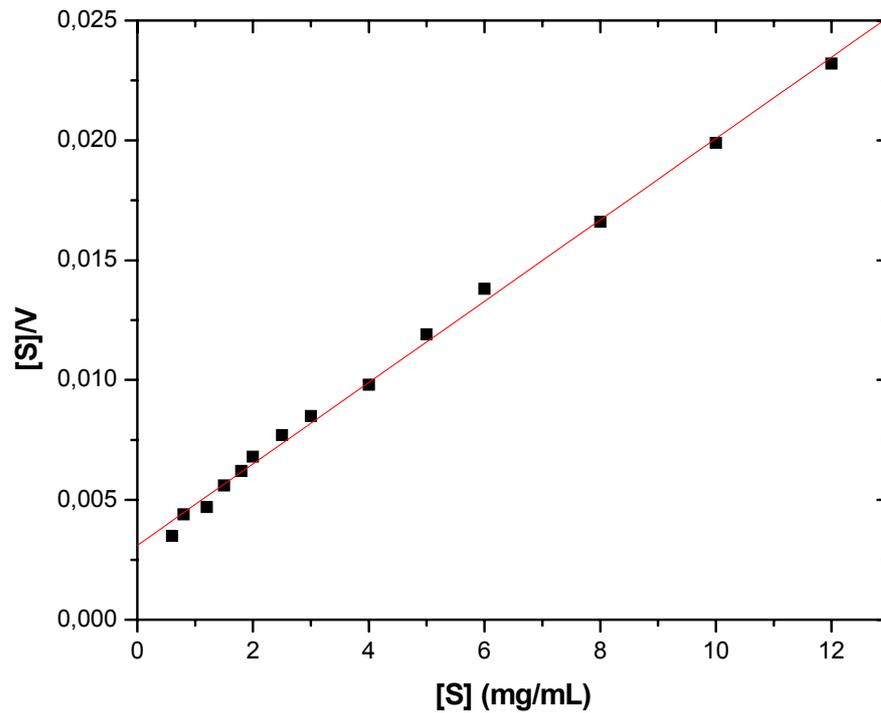


Figura 15: Representação gráfica de Hanes para determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para hidrólise de polipectato de sódio, pela poligalacturonase.

Tabela 15: Constantes cinéticas aparentes da poligalacturonase.

Substrato	K_m (mg/mL)	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mols açúcares}$ redutores/min/mg prot)	$V_{m\acute{a}x}/K_m$
Polipectato de sódio	1,84	432	234,8

4.25 Efeito do pH sobre a hidrólise do substrato pela poligalacturonase

A influência do pH na atividade enzimática foi verificada em tampão McIlvaine, pH 3,0 a 8,0 variando em 0,5 unidade.

O pH ótimo para a atividade da poligalacturonase purificada de *Paecilomyces variotii* foi 4,0 (**Figura 16**). Dados da literatura mostram que os pHs ótimos de atividade das enzimas da maioria dos fungos variam de ácidos a neutros.

4.26 Efeito do pH sobre a estabilidade da poligalacturonase em ausência de substrato

Para determinar a estabilidade da enzima frente a variações de pH, em ausência de substrato, a mesma foi incubada em tampão McIlvaine, pH 3,0 a 8,0 variando em 0,5 unidade, durante 24 horas, a 4°C (**Figura 17**).

Nota-se que a enzima demonstrou estabilidade na faixa de pH 3,0 – 6,0. Uma atividade residual de cerca de 95% foi observada até pH 6,0, a partir disto a enzima perdeu cerca de 30% de sua atividade. Esses resultados são de relevância para um processo de aplicação industrial uma vez que essas enzimas podem ser aplicadas sobre uma ampla escala de pH permanecendo ativas por um período de tempo relativamente longo.

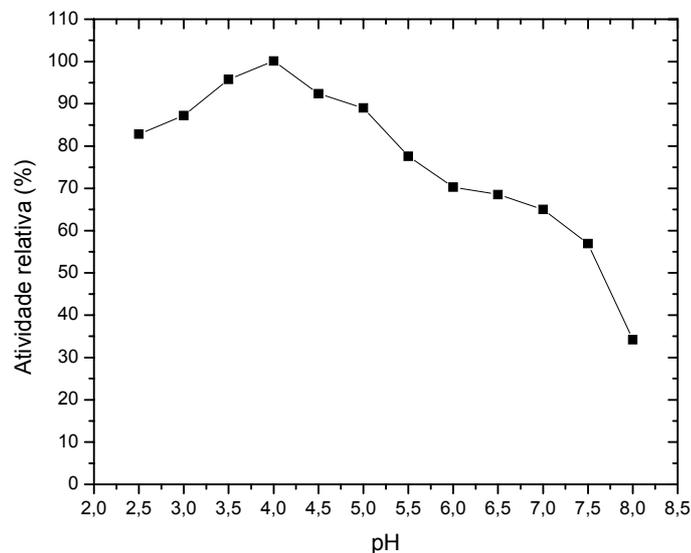


Figura 16: Influência do pH na atividade poligalacturonásica produzida por *Paecilomyces variotii*. A atividade enzimática foi estimada pelo método de DNS, tendo polipectato de sódio 1% (p/v) como substrato.

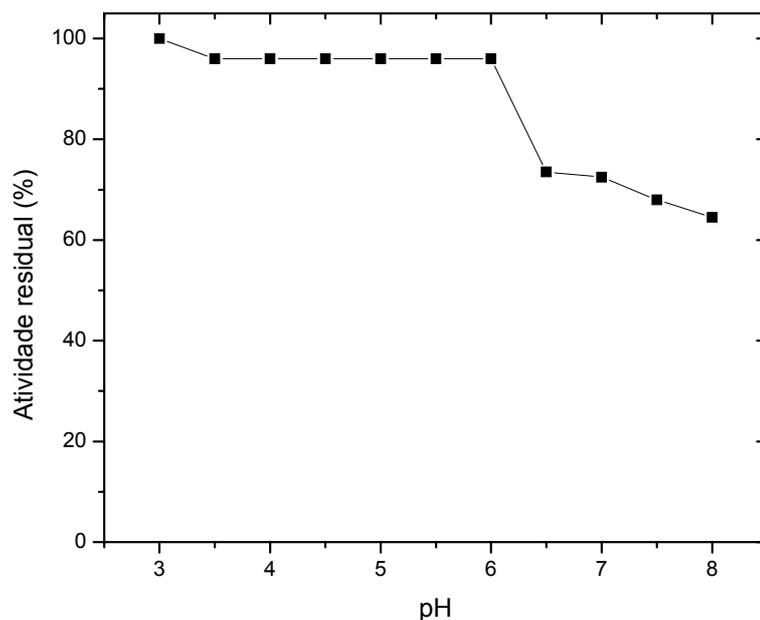


Figura 17: Estabilidade ao pH da atividade poligalacturonásica. A enzima foi incubada nos pHs de 3,0 a 8,0 durante 24 horas. A atividade enzimática foi estimada pelo método de DNS, tendo polipectato de sódio 1% (p/v) como substrato.

4.27 Efeito da temperatura sobre a hidrólise do substrato pela poligalacturonase

Para o estudo do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática, a solução enzimática foi incubada junto ao substrato, em pH ótimo de atividade, em temperaturas que variaram de 30 a 80°C. A temperatura ótima é definida como sendo aquela em que se evidencia a maior atividade enzimática e, conseqüentemente, a maior formação de produto e consumo de substrato (**Figura 18**). A atividade máxima ocorreu a 65°C, diminuindo gradativamente em temperaturas superiores ou inferiores a essa. A 30°C, observou-se uma diminuição na atividade enzimática de 76,5%. Na incubação a 80°C, restaram 43,7% da atividade máxima obtida na temperatura ótima.

4.28 Efeito da temperatura sobre a estabilidade da poligalacturonase em ausência de substrato

Para o estudo do efeito de temperatura sobre a estabilidade enzimática, a enzima purificada foi mantida em temperaturas de 45 a 55°C, com intervalo de 5°C, em ausência de substrato por até 90 minutos. Alíquotas foram retiradas em diferentes tempos para a dosagem das atividades residuais em pH e temperatura ótimos. Os resultados são mostrados na **Figura 19**.

A enzima mostrou-se altamente estável durante todo o tempo quando incubada a 45 e 50°C, já que manteve mais de 80% de atividade. A 55°C foi termoinativada em 50% depois de 45 minutos. Após 90 minutos, a 55°C, a enzima manteve em torno de 27% de sua atividade.

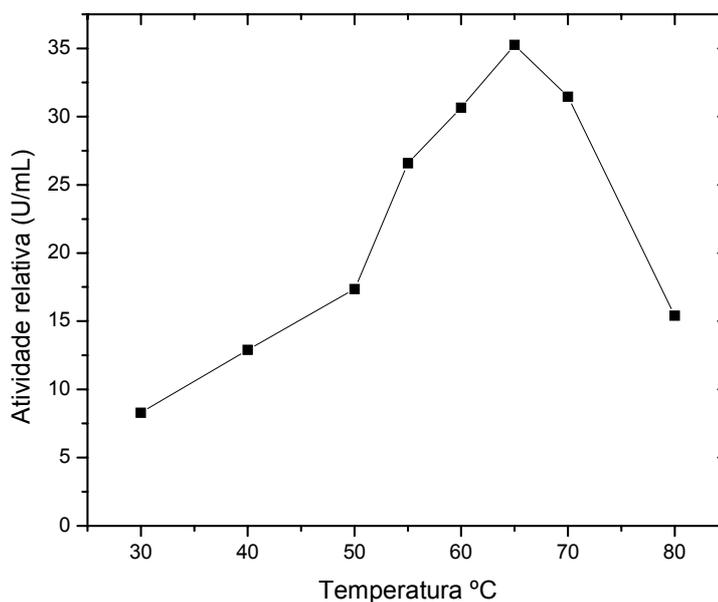


Figura 18: Influência da temperatura na atividade da poligalacturonase produzida por *Paecilomyces variotii*. A atividade foi estimada pelo método de DNS, tendo polipectato de sódio 1% (p/v) como substrato.

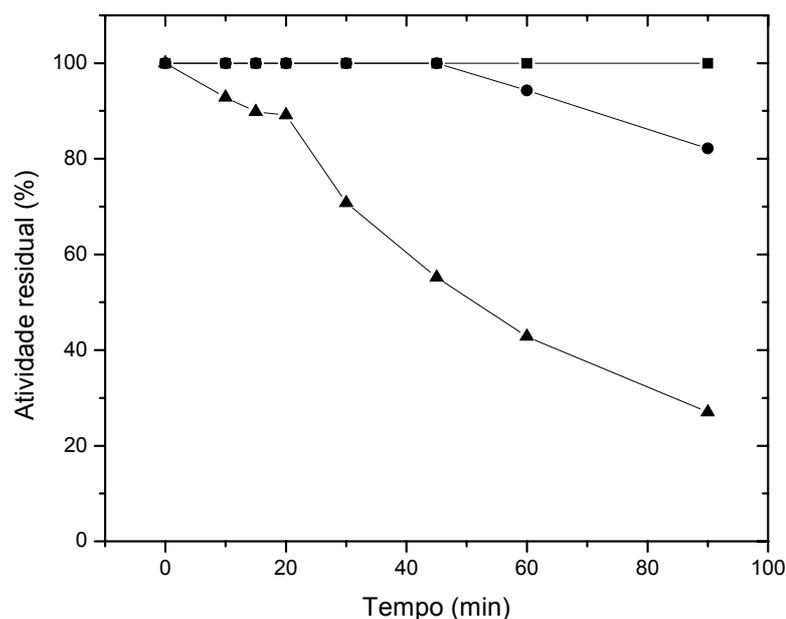


Figura 19: Termo-inativação da atividade poligalacturonásica a 45°C (■), 50°C (●) e 55°C (▲). A atividade foi estimada pelo método de DNS, tendo polipectato de sódio 1% (p/v) como substrato.

4.29 Efeito da adição de íons, EDTA e β-mercaptoetanol à mistura de reação, sobre a atividade da poligalacturonase

Na concentração de 1 mM os compostos AgNO_3 e $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ interferiram reduzindo cerca de 50% a atividade poligalacturonásica. Nenhum dos compostos testados demonstrou um aumento significativo da atividade enzimática (**Tabela 16**).

Na concentração de 10 mM, os compostos HgCl_2 , ZnCl_2 , AlCl_3 e AgNO_3 diminuíram significativamente a atividade enzimática, e novamente nenhum dos compostos testados aumentou a atividade enzimática (**Tabela 16**). β-mercaptoetanol e EDTA reduziram a atividade em média 12 e 10%, respectivamente.

O fato desta enzima ser estável a presença de pequenas quantidades de alguns dos íons testados, se torna vantajoso quando se visa uma aplicação em escala industrial.

Tabela 16: Efeito de diferentes íons sobre atividade enzimática.

Íons	Atividade Relativa (%)	
	1 mM	10 mM
Controle	100,0	100,0
B-mercaptoetanol	85,5	90,9
HgCl ₂	96,6	43,3
NH ₄ Cl	95,1	90,9
ZnCl ₂	96,3	13,9
MnCl ₂ .4H ₂ O	96,6	79,9
Fe ₂ SO ₄ .4H ₂ O	50,5	86,1
NaCl	106,9	99,2
MgCl ₂ .6H ₂ O	98,3	67,4
AlCl ₃	99,3	15,0
AgNO ₃	50,5	0,0
NaBr	106,2	108,5
NH ₄ F	97,3	93,5
Pb(C ₂ H ₃ O ₂).3H ₂ O	105,4	86,1
NaH ₂ PO ₄	102,5	92,1
KCl	103,0	94,3
EDTA	93,6	85,6
CuCl ₂	105,2	100,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	107,9	74,8
KH ₂ PO ₄	100,0	101,4

4.30 Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática

Os resultados da **Tabela 17** demonstram a atividade da poligalacturonase purificada de *Paecilomyces variotii* na presença de vários solventes.

Tanto na presença de solventes orgânicos imiscíveis em água (benzeno, tolueno e n-hexano) como na presença de solventes orgânicos miscíveis em água (etanol, isopropanol, acetona, metanol e DMSO) a atividade enzimática relativa manteve-se sempre acima de 70%, resultado este que mostra uma importante resistência desta enzima à presença de solventes orgânicos. Vale ressaltar que a concentração (v/v) de solventes orgânicos presente na reação enzimática foi de 20%.

Tabela 17: Efeito de solventes orgânicos na atividade poligalacturonásica.

Solvente	Índice de polaridade	Atividade relativa* (%)
Água	-	100
Isopropanol	9,3	72,1
metanol	6,6	73,8
DMSO	6,5	74,3
Acetona	5,4	79,2
Etanol	5,2	83,7
Benzeno	3,0	84,8
Tolueno	2,3	85,6
n-hexano	0	89,6

* Os solventes orgânicos (40 µL) foram adicionados a 160 µL de solução enzimática (33,75 U/mL). Desta mistura retirou-se 50 µL para dosagem de atividade enzimática.

4.31 Efeito de diferentes concentrações de NaCl na atividade enzimática

Para este experimento utilizou-se um volume final de 200 μ L de solução enzimática, adicionando-se diferentes concentrações de NaCl.

A poligalacturonase purificada de *Paecilomyces variotii* demonstrou alta estabilidade na presença de até 0,5M de NaCl, mantendo nesta concentração 89,6% de atividade relativa (**Tabela 18**). Este resultado se equipara à análise do efeito de íons sobre a atividade desta enzima, onde concentrações de 1 e 10 mM de NaCl não apresentaram efeitos inibitórios sobre a atividade poligalacturonásica.

Tabela 18: Efeito da concentração de NaCl na atividade poligalacturonásica.

NaCl (M)	Atividade Relativa (%)
0	100
0,05	98,2
0,10	97,7
0,15	96,3
0,20	95,8
0,25	95,7
0,30	95,1
0,40	90,1
0,50	89,6

4.32 Produção de anticorpos policlonais anti-poligalacturonase extracelular

Os anticorpos gerados numa resposta imune são uma mistura de moléculas de diferentes especificidades e afinidades. Os chamados anticorpos policlonais, são um conjunto de anticorpos com diferentes especificidades. Ainda que o antígeno que serviu

para inocular o animal seja bastante puro, o imunosoro obtido é sempre constituído por uma mistura de anticorpos dirigidos contra os diferentes epítomos (locais determinantes). Eles são tanto mais numerosos quanto mais complexo for o antígeno.

A produção de anticorpos anti-poligalacturonase foi realizada utilizando-se coelhas New Zealand devidamente imunizadas, sendo que a quantificação dos anticorpos assim produzidos foi realizada por teste ELISA em um espectro com filtro de 490 nm.

A titulação obtida para os anticorpos anti-poligalacturonase foi igual a 1:10000.

4.33 Western blotting

A produção de anticorpos anti-PG de *Paecilomyces variotii* foi importante para realização de experimentos futuros como, por exemplo, imunolocalização enzimática e estudos de similaridades estruturais entre poligalacturonases produzidas por diferentes fungos, estabelecendo-se correlações filogenéticas entre estes microrganismos.

No intuito de estabelecer uma análise comparativa entre a poligalacturonase de *Paecilomyces variotii* e a poligalacturonase purificada de *Aspergillus niveus*, foi realizado Western Blotting utilizando-se anticorpo anti-poligalacturonase (anti-PG) de *Paecilomyces variotii*. Este procedimento foi realizado conforme descrito no item 3.26.3 de Material e Métodos.

A reação do anticorpo foi realizada contra poligalacturonase de *Paecilomyces variotii*, onde houve reconhecimento da enzima purificada (antígeno) pelo anticorpo, e poligalacturonase de *Aspergillus niveus*. Os resultados revelaram que não há homologia entre as poligalacturonases destes organismos (**Figura 20**).

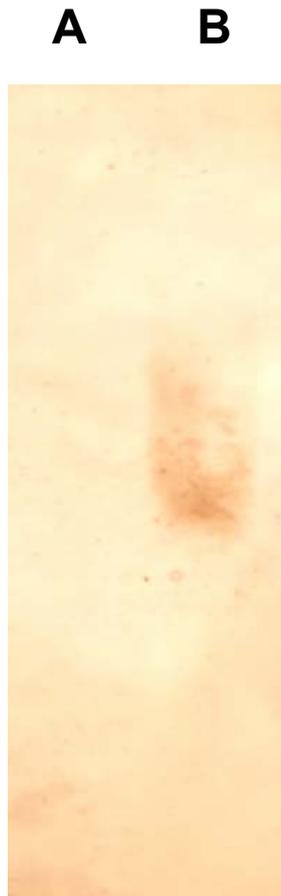


Figura 20: Western Blotting realizado com o anticorpo anti-PG de *Paecilomyces variotii*. **(A)** PG de *Aspergillus niveus*; **(B)** PG de *Paecilomyces variotii*.

5. DISCUSSÃO

Trabalhar com proteínas, particularmente enzimas é um segmento crescente da indústria de biotecnologia (RUBINGH, 1997). Os microrganismos, de modo especial os fungos, são fontes interessantes para obtenção de enzimas de interesse biotecnológico além de servirem como modelos para o entendimento dos vários processos metabólicos em eucariotos. Da mesma forma, pesquisas com pectinases revelaram seu potencial biotecnológico em vários ramos da indústria, incluindo alimentos, cervejaria, vinho, ração animal, têxtil, indústria de polpa, papel e agricultura. Junto a isso, soma-se à escassa literatura a cerca dos microrganismos encontrados no Estado de São Paulo. Desta forma, entre as várias espécies de fungos filamentosos coletados em diferentes regiões do Estado de São Paulo e disponíveis em nosso laboratório, o fungo *Paecilomyces variotii* apresentou os maiores níveis de produção de poligalacturonases, além disto, não aparece na literatura como uma linhagem produtora das mesmas. Um outro fator que determinou nossa escolha por esse fungo foi o fato de o mesmo já ter sido identificado, o que evitaria o risco de trabalhar com linhagens já estudadas.

Independente do procedimento utilizado, a produção de enzimas por microrganismos está intimamente ligada às condições ambientais de cultivo. Assim sendo, neste trabalho estudou-se numa primeira etapa, a influência de diferentes fatores sobre a produção de enzimas pectinolíticas por *Paecilomyces variotii* em cultura submersa.

Com a seleção de *Paecilomyces variotii* como o melhor produtor de poligalacturonases dentre as linhagens testadas, alguns meios de cultura foram estudados para avaliar o crescimento e a produção enzimática. Os resultados

mostraram que o meio Czapeck em condições físicas de cultivo estacionário foi o mais adequado, tanto no suprimento das necessidades fisiológicas, quanto na síntese das enzimas. MOHAMED e outros (2006), utilizaram o meio líquido batata dextrose adicionado de 0,1% de pectina cítrica para induzir a produção de poligalacturonase extracelular em *Trichoderma harzianum*. MOYO e outros (2003) descreveram a utilização do meio modificado de Kebede para a indução de atividade pectinolítica em *Kluyveromyces wickerhamii*.

Com 144 horas de cultivo, *Paecilomyces variotii* apresentou maior crescimento, já a atividade enzimática máxima ocorreu em 192 horas de cultivo, no entanto a partir de 120 horas o aumento na produção de poligalacturonase foi menos expressivo, em cultivo estacionário. A atividade de poligalacturonase em fungos está relacionada, dentre vários fatores, com a quantidade de oxigênio dissolvido no meio de cultura. Várias linhagens, como *K. marxianus* (SCHWAN & ROSE, 1994; BARNBY *et al.*, 1990), *K. fragilis* (GARCÍA-GARIBAY, 1987) e *K. lactis* (MURAD & FODA, 1992), exibem maior habilidade pectinolítica quando crescem sem agitação, e não se detecta atividade na presença de aeração. WIMBORNE & RICKARD (1978) demonstraram que em *S. fragilis* a atividade de poligalacturonase é completamente reprimida quando a tensão de oxigênio dissolvido (DOT) é de 60%, no entanto, eles encontraram uma atividade normal quando a DOT foi próxima a 0%. Em *Saccharomycopsis fibuligera* (FELLOWS & WORGAN, 1984), uma redução na concentração de O₂ dissolvido no meio de cultura causa um aumento na decomposição da pectina.

A curva de crescimento pode ser arbitrariamente dividida em quatro fases:

a) fase lag, durante a qual praticamente não ocorre divisão celular, porém há aumento de massa; b) fase logarítmica, na qual ocorre divisão regular numa

velocidade máxima e constante; c) fase estacionária, durante a qual a velocidade de multiplicação diminui gradualmente, até que se anule. O número de células presentes, por unidade de volume, permanece constante por um tempo determinado. Durante essa fase, o número de células novas que se forma contrabalança com o número daquelas que estão morrendo; d) fase de declínio, em que o microrganismo gradualmente diminui em número até que a cultura se torna estéril, ou seja, o microrganismo morre (TRABULSI *et al.*, 2002). Analisando ainda os resultados referentes ao tempo de cultivo foi possível observar que *Paecilomyces variotii* apresentou fácil adaptação ao meio, sendo a fase lag praticamente não evidenciada. A fase logarítmica é bem definida e se inicia com 48 horas de crescimento sendo o seu término verificado por volta de 120 horas. Nessa fase, o microrganismo teria necessidade de recursos prontamente assimiláveis garantindo a sua sobrevivência no meio, assim, justifica-se o pico de atividade por volta de 120 horas de cultivo, uma vez que nesse período a pectina estaria sendo degradada pelas enzimas para o consumo de monossacarídeos pelo fungo. A partir de 120 horas foi possível observar um declínio no crescimento, provavelmente devido à escassez nutricional e também por excesso de compostos secretados para o meio. CROTTI e outros (1999), ao estudarem a produção de enzimas pécnicas por *Talaromyces flavus* obtiveram picos de produção de poligalacturonase em 48 horas de cultivo em meio Manachini suplementado com 0,8% (p/v) de pectina, à 30°C, sob agitação constante.

Meios de cultivos com pHs iniciais próximos a neutralidade favoreceram a produção de poligalacturonase pelo fungo em estudo, embora este tenha mostrado capacidade de crescimento em todos os pHs testados. O pH inicial 7,0 foi padronizado como o mais adequado para a produção de poligalacturonase por

Paecilomyces variotii, no entanto, o fungo produziu quantidades significativas de poligalacturonase em todos os pHs estudados. Estes dados são consistentes com valores encontrados para pectinases produzidas por fungos, pHs entre 4 e 6 (LUH e PHAF, 1954; LIM *et al.*, 1980; WHITAKER, 1991; SCHWAN *et al.*, 1997). Ainda com relação ao pH do meio, foi possível observar que após o término do processo fermentativo os valores de pH foram superiores àqueles iniciais do meio de cultivo. Segundo RAIMBAULT (1998), os valores de pH durante o processo fermentativo podem aumentar ou diminuir em função dos produtos do metabolismo do microrganismo durante a fermentação. A secreção de ácidos orgânicos como ácido acético, ácido láctico e ácido cítrico proporciona um decréscimo nos valores de pH e por outro lado, a assimilação de ácidos orgânicos, juntamente com a hidrólise de algumas substâncias como uréia e proteínas, geralmente, causam um aumento no pH do meio de cultivo.

Como apresentado neste trabalho e relatado por outros autores, a produção de enzimas pectinolíticas está relacionada com parâmetros tais como: pH (MANACHINI *et al.*, 1988); temperatura (LARIOS *et al.*, 1989); concentração e tipo de substrato indutor (PETRUCCIOLI *et al.*, 1989); agitação e aeração (FRIEDRICH *et al.*, 1990).

A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que afetam o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos. Cada organismo apresenta uma temperatura mínima, abaixo da qual é incapaz de crescer, e uma temperatura máxima, acima da qual ocorre a morte da célula microbiana. A temperatura ótima de crescimento de um organismo sempre se encontra mais próxima da temperatura máxima do que da temperatura mínima (MADIGAN *et al.*, 2003).

O efeito da temperatura de cultivo sobre a síntese de poligalacturonases e o crescimento micelial do fungo *Paecilomyces variotii* foi estudado incubando-se o microrganismo em temperaturas que variaram de 25 a 50°C, em intervalos de 5°C. O microrganismo cresceu em temperaturas entre 25 e 40°C, porém a 45 e 50°C não houve crescimento. Foi possível observar ainda que a melhor temperatura para crescimento do fungo foi a 25°C. A maior produção enzimática (U/mL) foi detectada em cultivo a 30°C. O estabelecimento de uma temperatura ótima de cultivo na produção de enzimas por microrganismos é prática rotineira neste tipo de estudo e a temperatura ideal está evidentemente relacionada às características de cada microrganismo. Por outro lado, nem sempre a melhor temperatura de crescimento é a melhor temperatura de síntese enzimática como neste estudo com *Paecilomyces variotii*.

O uso de resíduos agro-industriais para a produção enzimática fornece substratos alternativos, além de ajudar a solucionar os problemas de poluição que o descarte dos mesmos pode causar no ambiente. Devido a tal importância várias fontes de carbono foram testadas e o microrganismo em estudo foi capaz de crescer e sintetizar as enzimas em todas elas, tomando-se como parâmetro o cultivo em meio ausente de fonte de carbono. Todas os tipos de pectina testados induziram a produção de poligalacturonase, destacando-se pectina Sigma, pectina USP-B e pectina 7128, sendo superiores em cerca de 28, 25 e 23 vezes ao meio de cultivo sem fonte de carbono. Dentre os resíduos estudados, casca de maçã, buriti e casca de laranja demonstraram bons níveis de indução enzimática, sendo fontes alternativas interessantes para uma produção em larga escala. Foi possível observar um ligeiro crescimento do microrganismo em meio de cultivo sem adição de fonte de carbono e, conseqüentemente, uma pequena produção enzimática. Isso pode ser

explicado pelo fato de haver no meio de cultivo, sais, proteínas e vitaminas provenientes do extrato de levedura o que seria aproveitado pelo fungo para o crescimento.

A concentração do substrato indutor no meio de cultivo também interferiu na produção de poligalacturonase por *Paecilomyces variotii*, pois os níveis enzimáticos obtidos de culturas suplementadas com 1,25% de pectina Sigma foram cerca de 6 vezes maiores do que quando essa concentração foi de 0,25%. CROTTI e outros (1999), ao estudarem a produção de enzimas pécticas por *Talaromyces flavus* obtiveram picos de produção de poligalacturonase com 0,8% de pectina, sendo que com 1% ou 1,5% os níveis enzimáticos foram menores.

A produção de pectinases é uma capacidade constitutiva em fungos e leveduras porque pectina, ácido poligalacturônico e ácido galacturônico não são necessários para induzir a síntese destas enzimas. No entanto, a capacidade pectinolítica de algumas espécies, como *C. albidus* (FEDERICI, 1985), *G. lactis* (PARDO *et al.*, 1991) ou *K. fragilis* (GARCÍA-GARIBAY, 1987), foi descrita como sendo induzível. A poligalacturonase de *S. fragilis* (LIM, 1980) é parcialmente constitutiva, onde a atividade de poligalacturonase é maior após crescimento com 2% de glicose + 1,8% de pectina do que quando as células crescem com 1% glicose somente. Em *K. marxianus*, pectina não induz nenhum aumento na atividade pectinolítica (SCHWAN & ROSE, 1994) e o mesmo é verdadeiro para a poligalacturonase de *S. cerevisiae* (BLANCO, 1994, 1997). No caso de *Paecilomyces variotii* o aumento nas concentrações de glicose e a produção de poligalacturonase estão intimamente relacionadas. A produção é maior na combinação de pectina 1% e glicose 1%, do que quando as células crescem com 1% glicose somente. Conclui-se, que a produção de poligalacturonase por

Paecilomyces variotii é parcialmente constitutiva. Por ser uma fonte de carbono prontamente assimilável, a glicose é consumida totalmente proporcionando um aumento de massa micelial. Em seguida, devido a escassez de fontes de fácil assimilação, o microrganismo inicia a produção das enzimas necessárias a degradação da pectina em unidades monoméricas, antes de serem incorporadas ao nível celular.

Outra característica comum entre enzimas pécticas é a repressão da síntese por glicose. Este efeito foi descrito em *S. cerevisiae* (BLANCO, 1994, 1997) e *C. albidus* (FEDERICI, 1985). SCHWAN & ROSE (1994) encontraram que o efeito repressivo de glicose em poligalacturonase de *K. marxianus* foi totalmente evidente quando a concentração de açúcar no meio foi cerca de 10%.

A pressão osmótica, é a força com a qual um solvente se movimenta, de uma solução menos concentrada para uma solução mais concentrada, através de uma membrana semi-permeável. Microrganismos são muitas vezes capazes de viver em meios hipotônicos, ou seja, meios em que a concentração de solutos é menor que a sua própria concentração de solutos. Quando estes microrganismos são transferidos para meios de concentração de soluto mais elevada que a do seu soluto interno, eles sofrem o fenômeno de plasmólise (perda de água). Alguns microrganismos conseguem tolerar concentrações de sal da ordem dos 10% e são chamados halófilos facultativos, outros crescem em meios com concentrações de sal de 15 a 20%, denominadas halófilos extremos.

Um ponto abordado por muitos pesquisadores, é o efeito que concentrações salinas exercem na produção enzimática em microrganismos. Alguns estudos (FIEDUREK, 1998; KIM *et al.*, 1985; PANDEY *et al.*, 1994; VILLAREJO *et al.*, 1983; CEREIA *et al.*, 2000) demonstram que quando alguns microrganismos são

cultivados em meios suplementados com cloreto de sódio (NaCl), a exportação de algumas enzimas para o meio extracelular aumenta, devido a pressão osmótica. Isto também é válido para *Paecilomyces variotii*, para o qual a adição de NaCl ao meio de cultura favoreceu o aumento da atividade de poligalacturonase em média de 1,86 vezes, sendo que com 0,25% de NaCl este aumento foi de 2,53 vezes.

No experimento com várias fontes de carbono, ácido monogalacturônico (produto da ação de uma exo-poligalacturonase) foi um bom indutor para produção desta enzima. Por isso, testou-se várias concentrações (0,1 a 2%) deste monômero no meio de cultivo. Comparando os resultados com um controle (pectina 1%) observou-se que o ácido monogalacturônico foi um melhor indutor da produção de poligalacturonase, além disso, nas concentrações testadas, quanto maior a quantidade do mesmo, maior era a produção desta enzima.

A fermentação substrato sólido é uma técnica empregada pelo homem desde a Antiguidade, na fabricação de comidas fermentadas e certos tipos de queijos. Ainda hoje, esta técnica predomina em países como o Japão, a China e a Tailândia na produção de bebidas e alimentos temperados, tais como o *koji*, o *miso* e o *tempeh*. Entretanto, desde a década de 40, devido ao grande desenvolvimento de equipamentos e instrumentação adequados à fermentação submersa, o mundo ocidental vem dando especial ênfase a este tipo de cultivo em detrimento da fermentação substrato sólido (NIGAM & SINGH, 1994).

Recentemente, a conscientização da importância do uso de materiais biológicos como matérias-primas renováveis para a obtenção de energia, produtos químicos e alimentos, assim como a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais e florestais como matérias-primas de custo reduzido em fermentações substrato sólidas, reavivou o interesse por esta forma de cultivo. As

fermentações em estado sólido apresentam diversas vantagens em relação à fermentação submersa (HESSELTINE, 1972):

- menores riscos de contaminação, devido à baixa umidade do meio de fermentação;
- simplicidade no preparo do meio de fermentação, pois necessita-se normalmente apenas do ingrediente principal e de água para umedecimento;
- possibilidade de emprego de resíduos abundantes e de custo reduzido como matéria-prima, especialmente em países como o Brasil;
- menor necessidade de espaço e pouca complexidade dos equipamentos; e
- muitas vezes, maiores rendimentos e concentração mais alta do produto desejado, barateando as normalmente onerosas etapas de *downstream processing*.

HESSELTINE (1972) reportou rendimentos de um metabólito secundário (ocratoxina) bastante superiores aos obtidos por fermentação submersa, quando realizou fermentação semi-sólida de arroz com *Aspergillus ochraceus*. TREJO-HERNÁNDEZ *et al.* (1991) observaram maiores rendimentos, menores tempos de fermentação e maiores produtividades na produção de pectinases por *Aspergillus niger* em meio sólido.

Mesmo com todas as vantagens citadas, no caso da produção de poligalacturonase por *Paecilomyces variotii* a utilização de fermentação em meio substrato sólido não se mostrou otimista, visto que a produção enzimática em fermentação submersa foi significativamente maior.

Para que as indústrias possam utilizar as enzimas isoladas de microrganismos, em alguns casos, elas devem antes passar por processos de purificação. As técnicas mais comuns utilizadas para o processo de purificação são cromatografia de troca-iônica e filtração em gel, as quais são normalmente

combinadas (AMIRUL *et al.*, 1996; BOLTON *et al.*, 1997; SILVA & PERALTA, 1998; MAMO & GESSESSE, 1999).

Nesse trabalho, vários protocolos de purificação foram testados. Em um primeiro momento, testou-se a precipitação de proteínas do extrato bruto com sulfato de amônio, onde houve uma perda de 40% da atividade enzimática total.

Outro protocolo foi a aplicação do extrato bruto em DEAE-celulose (resina trocadora aniônica) onde houve a interação da poligalacturonase com a resina, sendo a mesma eluída com um gradiente de 0-1 M de NaCl. O “pool” de atividade foi reunido, dialisado contra água destilada, a 4°C, para retirada do NaCl e em seguida aplicada em Concanavalina A Sepharose (interação por afinidade a carboidrato), na qual houve interação enzimática com a resina, provavelmente devido a presença de 27,5% de carboidratos na estrutura desta poligalacturonase. A mesma foi eluída com um gradiente de 0-500 mM do açúcar metil- α -D-manopiranosídeo. Este protocolo resultou em uma poligalacturonase purificada, no entanto, devido ao alto custo da resina e também do açúcar metil- α -D-manopiranosídeo, optou-se por se estabelecer um protocolo mais viável.

A purificação da poligalacturonase ocorreu após a aplicação do extrato enzimático em colunas cromatográficas de troca-iônica (DEAE-Fractogel) e filtração (Sephadex G-100), respectivamente. Dessa forma, obteve-se uma poligalacturonase purificada 10,1 vezes e com uma recuperação de 47% (Tabela 5). Pectinases de fungos e bactérias têm sido purificadas com aparente homogeneidade por diferentes processos cromatográficos, incluindo filtração em gel e troca iônica com diferentes níveis de recuperação e purificação (GUMMADI & PANDA, 2003).

Uma coluna de filtração Sephadex G-100 foi utilizada para obtermos uma poligalacturonase com maior atividade específica (300,8 U/mg proteína), a qual

representou de 9–20 vezes maior do que poligalacturonases de *Bacillus* sp. (KOBAYASHI *et al.*, 2001), *A. niger* (SAKAMOTO *et al.*, 2002) e *Fusarium moniliforme* (NITURE & PANT, 2004).

Uma exo-poligalacturonase foi separada do extrato micelial de *Aspergillus niger* por eluição em DEAE-celulose com tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 4,6. Esta purificação foi eficiente com um aumento de 209 vezes na atividade específica e 8,6% de recuperação (MILL, 1966a). Uma segunda poligalacturonase foi isolada com aumento de 205 vezes na atividade específica e 1% de recuperação (MILL, 1966b). Uma endo-poligalacturonase extracelular produzida por *Aspergillus awamori* IFO 4033 foi purificada utilizando colunas cromatográficas de troca-iônica e filtração (NAGAI *et al.*, 2000). MOHAMED e outros (2006) relataram a purificação de uma poligalacturonase de *Trichoderma harzianum* após eluição do extrato bruto em DEAE-Sepharose e Sephacryl S-200 com atividade específica de 276 U/mg. Uma endo-poligalacturonase de *Mucor flavus* foi purificada com 51% de recuperação e atividade específica de 575 U/mg após eluição do extrato bruto em CM-Sepharose CL 6B, o pico de atividade foi coletado, dialisado, concentrado e aplicado novamente na mesma coluna cromatográfica.

O grau de homogeneidade da poligalacturonase de *Paecilomyces variotii* foi verificado através de análises eletroforéticas em PAGE (Figura 8).

Estimativa da massa molecular da poligalacturonase purificada foi feita através de SDS-PAGE (Figura 9). O valor de massa molecular encontrado para poligalacturonase purificada foi de 79,4 kDa, sendo este resultado confirmado após determinação da massa molecular por cromatografia de filtração em gel em HPLC. Esta análise também conclui que esta poligalacturonase possui apenas uma subunidade, ou seja, uma proteína monomérica. A massa molecular de PGII de *T.*

Harzianum foi estimada em 31 kDa por filtração em gel, sendo confirmada por SDS-PAGE (MOHAMED *et al.*, 2006). Estes resultados são semelhantes aos descritos para PGs de *Fusarium moniliforme* (NITURE & PANT, 2004) e *Saccharomyces cerevisiae* (BLANCO *et al.*, 1997). Em comparação com outros *Trichoderma sp.*, massas moleculares menores também foram detectadas para PGI (66 kDa) e PGII (63 kDa) de *T. reesei* (MOHAMED *et al.*, 2003). Massa molecular maior foi detectada para PG de *Bacillus sp.* (115 kDa) (KOBAYASHI *et al.*, 2001).

O modo de ação de poligalacturonases (exo-PG ou endo-PG) geralmente é determinado pela verificação dos produtos de hidrólise do ácido poligalacturônico ou polipectato de sódio, através de cromatografia em camada delgada (CCD) ou pelo acompanhamento da redução de viscosidade de uma solução de pectina ou ácido poligalacturônico, utilizando-se um viscosímetro de Ostwald. Uma endopoligalacturonase ou poli (1,4- α -D-galacturonídeo) glucanohidrolase (EC 3.2.1.15) tem por característica clivar ao acaso as ligações α -1,4 do ácido péctico produzindo mono-, di-, e oligogalacturonatos, como produtos finais de reação. Já uma exopoligalacturonase ou poli (1,4- α -D-galacturonídeo) galacturonohidrolase (EC 3.2.1.67) tem por característica catalisar a hidrólise sequencial das ligações glicosídicas α -1,4 do ácido péctico.

Para análise do modo de ação da poligalacturonase purificada de *Paecilomyces variotii*, utilizamos cromatografia em camada delgada, onde observamos apenas a formação de ácido monogalacturônico, caracterizando clivagens nas extremidades destas moléculas, característica de uma exopoligalacturonase. Além disso, todas as dosagens enzimáticas foram realizadas pelo método de MILLER (1959) que detecta a presença de açúcares redutores, neste caso, ácido monogalacturônico. Como rotineiramente os tempos reacionais

foram de apenas 5 e 10 minutos, onde já verificávamos grande produção de ácido monogalacturônico a partir da clivagem de polipectato de sódio, pudemos inferir também que trata-se de uma exopoligalacturonase.

A maioria das enzimas fúngicas extracelulares são glicoproteínas (TORRALBA *et al.* 1998). A glicosilação das proteínas é fator importante na termoestabilidade. Muitas termoenzimas de eucariotos e procariotos são glicosiladas, embora poucos exemplos em hipertermófilos tenham sido descritos. A glicosilação aumenta a termoestabilidade sem afetar as dobras e a conformação da proteína (SUTHIRAKI *et al.*, 2005).

De acordo com KAWANO *et al.* (1999), uma exopoligalacturonase I é parte de um complexo enzimático, onde os efeitos do composto tunicamicina (TM) na glicosilação sugere que a exopoligalacturonase é uma N-glicoproteína, um fato importante para sua secreção e atividade. Uma exopoligalacturonase descrita para *Penicillium frequentans* (CHELLEGATTI *et al.*, 2002) apresentou uma quantidade excepcional de carboidratos (81%). Quantidades semelhantes também foram descritas para *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Aspergillus tubingensis* e *Alternaria mali* (DI PIETRO *et al.* 1996; KESTER *et al.* 1996; NOZAKI *et al.* 1997). A poligalacturonase purificada de *Paecilomyces variotii* apresentou 27,5% de carboidratos, valor este inferior ao conteúdo de carboidratos das enzimas produzidas pelos microrganismos citados acima, por outro lado, uma quantidade superior às descritas para PGI (4%) e PGII (8,6%) produzidas por *Fusarium moniliforme* (NITURE & PANT, 2004).

Ponto isoelétrico ou *pI*, é o valor de pH onde uma molécula, por exemplo, um aminoácido ou uma proteína, apresenta carga elétrica líquida igual a zero. O *pI* é o pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos

iônicos de um aminoácido ou de uma proteína. A diferença entre os valores de pI de proteínas pode ser utilizado para separá-las, submetendo-as à migração eletroforética em um gradiente de pH, técnica denominada focalização isoeletrica.

Geralmente, poligalacturonases microbianas apresentam pI ácido (KOBAYASHI *et al.*, 2001; CONTRERAS-ESQUIVEL & VOGET, 2004) ou alcalino (NITURE & PANT, 2004; ZHANG *et al.*, 1999). Similarmente, para exopoligalacturonase de *Paecilomyces variotii* o ponto isoeletrico determinado após focalização isoeletrica em gel de poli-acrilamida, utilizando anfólitos Pharmalite com pH de 2,0 a 5,0, foi ácido (4,37). Uma poligalacturonase ácida purificada de *Aspergillus kawachii* apresentou pI de 3,55. Já uma endopoligalacturonase produzida pelo fungo psicrófilo *Mucor flavus* apresentou pI de 8,3 (GRADE *et al.*, 2003).

Um estudo da hidrólise de diferentes substratos foi feito para poligalacturonase de *Paecilomyces variotii*, utilizando-se pectinas com diferentes níveis de grupos metil e outros polissacarídeos. A atividade enzimática com os diferentes substratos foi comparada à atividade com polipectato de sódio (100%). A hidrólise das diferentes pectinas foi diminuída com o aumento do grau de metoxilação (GM), onde com pectina Sigma (GM=9%), pectina 8003 (GM=30%), pectina 8001 (GM=30%), pectina 7128 (GM=70%) e pectina JMH6 (GM=70%), a enzima apresentou atividades relativas de 67,6%, 58,3%, 50,1%, 42,9% e 33,2%, respectivamente. Resultados semelhantes foram reportados para várias poligalacturonases de diferentes fontes, onde a hidrólise de pectina diminuía com o aumento do grau de metoxilação (MOHAMED *et al.*, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2001; CONTRERAS-ESQUIVEL & VOGET, 2004).

Genericamente, os estudos de cinética enzimática mostram que: (1) a velocidade varia linearmente com a concentração de enzima; (2) a velocidade varia linearmente com a concentração de substrato, para baixas concentrações; (3) a dependência da velocidade com a concentração de substrato define uma hiperbole retângular.

Os valores de K_m (1,84 mg/mL) e $V_{m\acute{a}x}$ (432 μ mols açúcares redutores/min/mg proteína) para exo-poligalacturonase purificada de *Paecilomyces variotii* foram calculados conforme procedimento descrito por HANES (1932). Baseando-se neste valor de K_m , esta enzima apresenta uma menor afinidade ao substrato quando comparada a PGI ($K_m=0,110$ mg/mL) e PGII ($K_m=0,166$ mg/mL) produzidas por *Fusarium moniliforme* (NITURE & PANT, 2004). Por outro lado, estes resultados são comparados favoravelmente aos descritos para *Trichoderma harzianum* (MOHAMED *et al.*, 2006), *Neurospora crassa* (POLIZELI *et al.*, 1991) e *Saccharomyces pastorianus* (ASTAPOVICH & RYABAYA, 1997).

Diferenças em propriedades enzimológicas são comumente descritas em diferentes linhagens. Um alto grau de variabilidade genética pode ser uma característica de um organismo vivendo em diferentes habitats (JOHNSON, 1979). Assim, a poligalacturonase purificada foi submetida a ensaios de caracterização bioquímica.

Foi verificado que o pH ótimo de reação, para degradação de pectato de sódio foi 4,0. MOHAMED e outros (2006), observaram pH ótimo de reação de 5,0 em tampão acetato de sódio 50 mM. O mesmo pH ótimo foi descrito para poligalacturonases (PG) de *Aspergillus niger* (BEHERE *et al.*, 1993) e *Fusarium moniliforme* (NITURE & PANT, 2004). No entanto, o pH ótimo de PGs de *T. reesei* foram 4.5 e 4.2 (MOHAMED *et al.*, 2003).

Quanto a estabilidade ao pH da poligalacturonase purificada em ausência de substrato, a mesma demonstrou estabilidade na faixa de pH 3,0 – 6,0. Uma atividade residual de cerca de 95% foi observada até pH 6,0, a partir disto a enzima manteve mais que 50% de atividade até pH 8,0. Em estudos realizados com PG de *T. harzianum* (MOHAMED *et al.*, 2006) os resultados mostraram que a enzima foi estável em pH 5,0 e manteve 49% e 75% de sua atividade em pH 4,0 e 6,0, respectivamente. O tempo de meia vida de atividade enzimática foi de 24 horas em pH 4,0. A enzima perdeu por volta de 70-80% de sua atividade em pH 3,0 e pHs de 7,0 a 11. A estabilidade ao pH também foi determinada para PG de *Mucor flavus*, onde a enzima foi completamente estável entre pH 2,5 e 6,0 por 20 horas a 20°C, mas em pH 7,0, a estabilidade diminuiu para 60% (GRADE *et al.*, 2003). KOBAYASHI *et al.* (2001) demonstrou que PG de *Bacillus* sp. foi muito estável em vários tampões 50 mM entre pH 6 e 12, onde a incubação se deu a 30°C, por 1 hora.

A temperatura ótima para atividade de PG foi de 65°C. MOHAMED *et al.* (2006) determinou uma temperatura ótima de 40°C para PG de *T. harzianum*, onde a enzima manteve 30% de sua atividade a 60°C. Da mesma forma, a temperatura ótima para PG de *Bacillus* sp. (KOBAYASHI *et al.*, 2001), *Mucor flavus* (GRADE *et al.*, 2003) and *T. reesei* (MOHAMED *et al.*, 2003) foi em torno de 40 e 50°C. Esta última também foi a temperatura ótima de reação determinada para *Aspergillus niger* CH4 (ACUNA-ARGUELLES *et al.*, 1995) e *Penicillium frequentans* (BORIN *et al.*, 1996). CHANNE & SHEWAL (1995) encontraram uma PG produzida por *Sclerotium rolfsii* com temperatura ótima de reação de 55°C.

A enzima se mostrou altamente estável durante 90 minutos quando incubada a 45°C e 50°C, sendo que manteve mais de 80% de atividade. A 55°C se manteve com até 80% de atividade depois de 20 minutos, sendo que a partir daí houve uma

queda acentuada de atividade. Esses dados são importantes para aplicação em processos industriais tendo em vista o longo período de tempo de aplicação dessas enzimas, nessas temperaturas. O efeito da temperatura na estabilidade térmica de PG produzida por *T. harzianum* (MOHAMED *et al.*, 2006) foi investigado por incubação da enzima por 15, 30 e 60 minutos, em diferentes temperaturas variando de 10 a 100°C na ausência de substrato. PG foi consideravelmente estável até 30°C nos três tempos de incubação. A atividade enzimática foi gradualmente diminuída com o aumento da temperatura e do tempo. Enquanto a enzima manteve 36.4% de sua atividade após 15 minutos de incubação, a mesma manteve 8% de atividade após 30 e 60 minutos a 70°C, respectivamente. O tempo de meia vida da atividade enzimática foi 30 min a 40°C. Por outro lado, PGs de *T. reesei* foram estáveis a 40 e 50°C (MOHAMED *et al.*, 2003). PG de *Bacillus* sp. foi estável a 45°C na ausência de CaCl₂ e a 50-55°C na presença do mesmo (KOBAYASHI *et al.*, 2001).

A catálise dos sistemas enzimáticos requer, freqüentemente, a presença não somente da enzima e do substrato, mas também de uma substância não protéica denominada de cofator (vitaminas), que são as coenzimas, e íons metálicos. As reações entre os íons metálicos e as enzimas formam um complexo organometálico (metaloenzima, metaloproteína) fundamental nos sistemas biológicos. Forças eletrostáticas desempenham uma parte importante na formação de ligações (covalentes) de íons de Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺, resultando em complexos muito estáveis. Metais como o manganês, ferro, cobre, molibdênio e zinco catalisam em geral reações de redox e participam na formação de centros enzimáticos ativos, ou como ativadores de uma ou várias enzimas. Contudo, o efeito de cada metal é específico.

Geralmente PG não depende de íons metálicos, o que foi observado para PG de *Paecilomyces variotii* onde nenhum dos íons testados ativaram a atividade enzimática, tanto a 1 mM quanto a 10 mM. MOHAMED e outros (2006), estudaram o efeito de diferentes íons metálicos na concentração de 1 mM sobre PG de *T. harzianum*. Todos os íons metálicos estudados mostraram diferente e parcial efeito inibitório sobre a atividade enzimática, exceto por Mn^{2+} e Co^{2+} que inibiram completamente a atividade enzimática. Vários estudos reportam o efeito de íons metálicos sobre PGs. A atividade de PG produzida por *Sporotrichum thermophile* Apinis foi estimulada por Fe^{2+} e Mn^{2+} , ambos a 1 e 5 mM, enquanto Ca^{2+} e Cu^{2+} estimularam somente a 1 mM, e inibiram a 5 mM. Mg^{2+} inibiu fortemente a atividade enzimática (KAUR *et al.*, 2004). PG de *Bacillus* MG-CP-2 foi estimulada por Ca^{2+} (KAPOOR *et al.*, 2000). Adição de 0.01mM de $HgCl_2$ aumentou a atividade de PG de *A. niger* em 3,4 vezes (SAKAMOTO *et al.*, 2002).

Enzimas halofílicas atuam sobre altas concentração salinas, e geralmente são estáveis em ambientes praticamente ausentes de água. Archaea é descrita como fonte deste tipo de proteínas e pode servir como modelo (DANSON & HOUGH, 1997; MARHUENDA-EGEA & BONETE, 2002). Ao verificar o efeito de altas concentrações salinas sobre a atividade da poligalacturonase purificada de *Paecilomyces variotii*, concluímos que, como já esperado, não se trata de uma enzima halofílica, no entanto, este enzima se mostrou altamente estável até 0,5M de NaCl no meio reacional.

Solventes orgânicos geralmente afetam a estabilidade e atividade das enzimas (ANTONINI *et al.*, 1981; CARREA, 1984). Enzimas com alta estabilidade e atividade na presença de solventes orgânicos possuem uma grande importância tecnológica na aplicação em processos onde se utilizam solventes. A exo-

poligalacturonase de *Paecilomyces variotii* apresentou elevadas atividades específicas na presença de 20% de solventes orgânicos miscíveis ou imiscíveis em água, mantendo sempre, no mínimo, aproximadamente 70% da atividade inicial.

Anticorpos policlonais são um conjunto de anticorpos com diferentes especificidades, que são produzidos em contato com um agente patogênico. Ainda que o antígeno seja bastante puro, o imunosoro obtido é sempre constituído por uma mistura de anticorpos dirigidos contra os diferentes epítomos (locais determinantes). Eles são tanto mais numerosos quanto mais complexo for o antígeno. São uma mistura complexa de anticorpos distintos, produzidos por clones individuais de linfócitos B.

Western blotting é um método em biologia molecular/bioquímica para detectar proteínas em um homogenato. Essa técnica utiliza eletroforese em gel para separar as proteínas desnaturadas por massa molecular. As proteínas são então transferidas do gel para uma membrana (tipicamente de nitrocelulose), onde são utilizados como sonda para anticorpos específicos à proteína. Com isso, pode-se examinar a quantidade de proteína em uma dada amostra e comparar os níveis entre diversos grupos.

A falta de similaridade entre as poligalacturonases de *Paecilomyces variotii* e *Aspergillus niveus*, determinada por Western Blotting, demonstra provavelmente diferenças estruturais entre estas enzimas, o que determinou a ausência de anticorpos que tenham complementariedade com epítomos da poligalacturonase de *Aspergillus niveus*.

6. CONCLUSÕES

Após o estudo de várias alterações dos parâmetros referentes ao cultivo de *Paecilomyces variotii*, com o objetivo de aumentar a produção de poligalacturonase, foram estabelecidas as seguintes condições: meio de cultivo Czapeck, pH 7,0, suplementado com pectina cítrica 1,25% como fonte de carbono, inóculo de 10^5 esporos do microrganismo, cultivo estacionário, a 30°C por 120 horas.

A purificação de uma exo-poligalacturonase (característica determinada por cromatografia em camada delgada) foi obtida após cromatografia de troca iônica (DEAE-Fractogel) e cromatografia de filtração (Sephadex G-100), onde obteve-se uma única forma de poligalacturonase, com fator de purificação de 10,1 vezes e 47,2% de recuperação.

Após a purificação, estudou-se algumas características físicas e bioquímicas da enzima em questão, onde a mesma apresentou pH e temperatura ótima de reação, 4,0 e 65°C, respectivamente, sendo estável até 50°C, e a uma faixa de pH de 3,0-6,0, por até 24 horas.

Esta exo-poligalacturonase também apresentou massa molecular de 79,4 kDa, ponto isoelétrico de 4,37, 25% de carboidratos em sua estrutura e os valores aparentes de K_m e $V_{máx}$ foram de 1,84 mg/mL e 432 μ mols açúcares redutores/min/mg prot.

Além disso, estudou-se o efeito da adição de alguns compostos durante a reação enzimática, onde observou-se inativação enzimática na presença de alguns íons metálicos como $AgNO_3$, $Fe_2SO_4 \cdot 4H_2O$, $AlCl_3$. Por outro lado, a enzima manteve-se estável na presença de até 0,5M de NaCl e apresentou considerável

estabilidade na presença de solventes orgânicos (isopropanol, metanol, DMSO, acetona, etanol, benzeno, tolueno, n-hexano).

Diante desses resultados considera-se a enzima com potencial para futuras aplicações biotecnológicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUNA-ARGUELLES, M. E., GUTIERREZ-RAJAS, M., VINIEGRA-GONZALEZ, G., FAVELA-TORESS, E., 1995. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *A. niger* in submerged and solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 43: 808-814, 1995.

ADAMS, P.R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopatologia**, 112: 35-37, 1990.

AITKEN, M.D, IRVINE, R.L. Characterization of reactions catalysed by manganese peroxidase from *Phanerochaete chysosporum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 276: 405-414, 1990.

ALICE-WEB. Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior, Secretaria de Comércio Exterior (SECEX), do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC). URL: <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br>. Acesso em: 07/11/2007.

ALKORTA, I., GARBISU, C., LLAMA, M.J., SERRA, J.L. Industrial applications of pectic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, 33 (1), 21-28, 1998.

AMIRUL, A.A.; KHOO, S.L.; NASALAN, M.N.; RAZIP, M.S.; AZIZAN, M.N. Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Aspergillus niger*. **Folia Microbiologica**, 41(2):165-172, 1996.

AMORIM, H.V., AMORIM, V.L. Coffee enzyme and coffee quality. In: Ori, R., St. Angelo, A.J. (Eds.), *Enzymes in Food and Beverage Processing*. ACS Symposium Series, vol. 47. pp. 27-56, 1977.

ANTONINI, E., CARREA, G., CREMONESI, P. Enzyme catalyzed reactions in water-organic solvent two-phase system. **Enzyme and Microbial Technology**, 3: 291-296, 1981.

ARMAND, S., WAGEMAKER, M. J. M., S'ANCHES-TORRES, S., KESTER, H. C. M., VAN SANTEN, Y., DIJKSTRA, B. W., VISSER, J., BENEN, J. A. E. The Active Site Topology of *Aspergillus niger* Endopolygalacturonase II as Studied by Site-directed Mutagenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, 275: 691-696, 2000.

ASTAPOVICH, N. I., RYABAYA, N. E. Isolation and characterization of polygalacturonase from *Saccharomyces pastorianus*. **Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia**, 33:287-291, 1997.

AYERS, W. A., PAPAIVIZAS, G. C., DIEM, A. F. Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, 56: 1006-1011, 1966.

BAILEY, M.J.; PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme and Microbial Technology**, 12: 266-271, 1990.

BAJPAI, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. **Biotechnology Progress**, 15: 147-157, 1999.

BARNBY, F.M., MORPETH, F.F. & PYLE, D.L. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification, and partial characterization of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, 12: 891-897, 1990.

BEG, Q. K., BHUSHAN, B., KAPOOR, M., HOONDAL, G. S. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 24: 396-402, 2000a.

BEG, Q. K., BHUSHAN, B., KAPOOR, M., HOONDAL, G. S. Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 16: 211-213, 2000b.

BEHERE, A., SATYANARAYAN, V., PADWAL-DESAI, S.R. Separation and limited characterization of three polygalacturonases of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, 15: 158-161, 1993.

BELL, T.A. & ETCHELLS, J.L. Pectin hydrolysis by certain salt-tolerant yeasts. **Applied Microbiology**. 4: 196-201, 1956.

BLANCO, P., SIEIRO, C., DÍAZ, A. & VILLA, T.G. Differences between pectic enzymes produced by laboratory and wild-type strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 13: 711-712, 1997.

BLANCO, P., SIEIRO, C., DÍAZ, A. & VILLA, T.G. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, 40: 974-977, 1994.

BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 8:93-99, 1987.

BOLTON, D.J.; KELLY, C.T.; FOGARTY, W.M. Purification and characterization of the α -amylase of *Bacillus flavothermus*. **Enzyme and Microbial Technology**, 20:340-343, 1997.

BORIN, M.D.F., SAID, S., FONSECA, M.J.V. Purification and biochemical characterization of an extracellular endopolygalacturonase from *Penicillium frequentans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44: 1616-1620, 1996.

BOURBONNAIS, R., PAICE, M. G. Veratrylic alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **The Biochemical Journal**, 255: 445-450, 1988.

CARR, J.G. Tea, coffee and cocoa. In: Wood, B.J.B. (Ed.), **Microbiology of Fermented Foods**, vol. II. Elsevier Applied Science, London, pp. 133±154, 1985.

CARREA, G. Biocatalysis in water-organic solvent two-phase systems. **Trends in Biotechnology**, 2: 102-106, 1984.

CEREIA, M., TERENCE, H. F., JORGE, J. A., GREENE, L. J., ROSA, J. C., POLIZELI, M. L. T. M. Glucoamylase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. Biochemical and regulatory properties. **Journal of Basic Microbiology**, 40(2): 83-92, 2000.

CHANNE, P.S., SHEWAL, J.G. Pectinase production by *Sclerotium rolfsii*: Effect of culture conditions. **Folia Microbiologica**, 40: 111-117, 1995.

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

CLARKE, J. H., DAVIDSON, K., RIXON, J. E., HALSTEAD, J. R., FRANSEN, M. P., GILBERT, H. J., HAZLEWOOS, G. P. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood pulp using a combination of xylanase, mannanase and α -galactosidase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 53: 661-667, 2000.

COLLMER, A., RIED, J.L., MOUNT, M.S. Assay methods for pectic enzymes. In: **Methods Enzymology**, v.161, p 326-335, 1988.

CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C., VOGET, C. E. Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. **Journal of Biotechnology**, 110: 21–28, 2004.

COUGHLAN MP. Cellulases: production, properties and applications. **Biochemistry Society Transactions**, 13:405–406, 1985a.

COUGHLAN MP. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. In: Russell GE, editor. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Vol. 3. Newcastle-upon-Tyne: Inter-science, pp. 39–109, 1985b.

CRANE, R. K. & SOLS, A. The association of hexokinase with particulate fractions of brain and other tissue homogenates. **The Journal of Biological Chemistry**, 203:273-292, 1953.

CROTTI, L. B., JABOR, V. A., CHELLEGATTI, M. A., FONSECA, M. J., SAID S. Studies of pectic enzymes produced by *Talaromyces flavus* in submerged and solid substrate cultures. **Journal of Basic Microbiology**, 39(4): 227-235, 1999.

CROTTI, L.B.; JORGE, J.A.; TERENCE, 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*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 20: 238-243, 1998.

CROTTI, L.B.; JORGE, J.A.; TERENCE, 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.

DANSON, M. J. & Hough, D. W. The structural basis of halophilicity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 3: 307-312, 1997.

DAVIS, B.J. Disc eletroforesis II. Methods and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 121:404-427, 1964.

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

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, 28:350-356, 1956.

EVARD, C., FASTREZ, J., SOUMILLION. Histidine modification and mutagenesis point to the involvement of a large conformational change in the mechanism of action of phage lambda lysozyme. **FEBS letters**, 460: 442–446, 1999.

FEDERICI, F. Production, purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. **Journal of molecular Microbiology and Biotechnology**, 51, 139-150, 1985.

FELLOWS, P.J. & WORGAN, J.T. An investigation into the pectolytic activity of the yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. **Enzyme and Microbial Technology**, 6: 405-410, 1984.

FIEDUREK, J. Enhancement of β -galactosidase production and secretion by high osmotic stress in *Penicillium notatum*. **Microbiological Research**, 153: 65-69, 1998.

FOGARTY, W. M. & WARD, O. P. Pectinases and pectic polysaccharides. **Progress in Industrial Microbiology**, vol. 13, 59-119, 1974.

FONTANA, J. D., GEBARA, M., BLUMEL, M., SCHNEIDER, H, MACKENZIE, C. R., JOHNSON, K. G. α -4-O-methyl-D-glucuronidase component of xylanolytic complexes. **Methods in Enzymology**, 160:560-571, 1988.

FRIEDRICH, J., CIMERMAN, A., STEINER, W. Production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: effect of inoculum size and potassium hexacyanoferrate II – trihydrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 33: 377-381, 1990.

GAINVORS, A., FREZIER, V., LEMARESQUIER, H., LEQUART, C., AIGLE, M. & BELARBI, A. Detection of polygalacturonase, pectin-lyase, and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, 11: 1493-1499, 1994.

GALANTE Y. M., DE CONTI A, MONTEVERDI R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: Harman GF, Kubicek CP, editors. **Trichoderma & Gliocladium – Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Vol. 2.** London: Taylor & Francis, pp. 327–42, 1998.

GARCÍA-GARIBAY, M., GÓMEZ-RUIZ, L. & BÁRZANA, E. Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology Letters**, 9: 411-416, 1987.

GLENN, J.K., AKILESWAREAN, L., GOLD, M.H. Mn(II) oxidation is the principle function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaetes chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 251: 688-696, 1986.

GODFREY, A. Production of industrial enzymes and some applications in fermented foods. In: Woods, B.J.B. (Ed.), **Microbiology of Fermented Foods**, vol. 1. Elsevier Applied Science, London, pp. 345-373, 1985.

GRADE, R.V., VAN DRIESSCHE, G., VAN BEEUMEN, J., BHAT, M.K. Purification, characterization and mode of action of an endopolygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. **Enzyme and Microbial Technology**, 32: 321–330, 2003.

GRASSIN C, FAUQUEMBERGUE P. Fruit juices. In: Godfrey T, West S, editors. **Industrial Enzymology**, 2nd ed. UK: Macmillan, pp. 226–4, 1996.

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

HANES, C. S. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. **The Biochemical Journal**, 26: 1406-1421, 1932.

HESELTIME, C. W. Biotechnology report: Solid state fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, 14: 517-532, 1972.

HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N., NASSER, W., ROBERT-BAUDOUY, J. Molecular characterization of the *Erwinia chrysanthemi kdgc* gene involved in pectin degradation. **Journal of Bacteriology**, 2386-2392, 1996.

JENKINS, J., PICKERSGILL, R. The architecture of parallel β -helices and related folds. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, 77(2): 111–175, 2001.

JOHNSON, E.J. Thermophile genetics and the genetic determinants of thermophily: in strategies of microbial life in extreme environments. Weinheim: Verlag Chemie, 471-487, 1979.

KAPOOR, M., BEG, Q.K., BHUSHAN, B., DADHICH, K.S., HOONDAL, G.S. Production and partial purification of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-CP-2. **Process Biochemistry**, 36: 467–473, 2000.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. **Applications of pectinases in the commercial sector: a review**. Elsevier Applied Science, London, 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 Technology**, 94: 239–243, 2004.

KAWANO, C. Y., CHELLEGATTI, M. A. S. C., SAID, S., FONSECA, M. J. V. Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 29: 133–140, 1999.

KERTESZ, Z. A new method for enzymic clarification of unfermented apple juice. **US patent no. 1.932.833**, New York State Agricultural Experimentation Station (Geneva) Bull. No. 689, 1930.

KESTER, H. C. M., KUSTERS-VAN-SOMEREN, M. A., MÜLLER, Y., VISSER, J. Primary structure and characterization of an exopolygalacturonase from *Aspergillus tubingensis*. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, 240: 738–746, 1996.

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

KILARA, A. Enzymes and their uses in the processed apple industry: A Review. **Process Biochemistry**, 23: 35-41, 1982.

KIM, H. K., MOSOBUCHI, M., KISHIMOTO, M. M., SEKI, T., RYU, D. D. Y. Cellulase production by a solid state culture system. **Biotechnology and Bioengineering**, 27: 1445-1450, 1985.

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

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

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

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; CIANCAGLINI, P. Enzyplot: A microcomputer assistant program for teaching enzyme kinetics. **Biochemical Education**, 23(1): 35-37, 1995.

LIM, J., TURNER, A. J. Chemical modification of porcine kidney aminopeptidase P indicates the involvement of two critical histidine residues. **FEBS Letters**, 381: 188–190, 1996.

LIM, J., YAMASAKI, Y., SUZUKI, Y. & OZAWA, J. Multiple forms of endopolygalacturonase from *Saccharomyces fragilis*. **Agricultural and Biological Chemistry**, 44: 473-480, 1980.

LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A. L., RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, 193, 267-275, 1951.

LUH, B.S. & PHAFF, H.J. Properties of yeast polygalacturonase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 48: 23-37, 1954.

LUH, B.S. & PHAFF, H.J. Studies on polygalacturonase of certain yeasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 33: 213-227, 1951.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. Prentice Hall. 10^a Ed., 2003.

MAMO, G.; GESSESSE, A. Purification and characterization of a two raw-starch-digesting thermostable α -amylase from a thermophilic *Bacillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, 25:433-438, 1999.

MANACHINI, P. L.; PARINI, C., FORTINA, M. G. Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* L.V.10. **Enzyme and Microbial Technology**, 10: 682-685, 1988.

MANTYLA A, PALOHEIMO M, SUOMINEN P. Industrial mutants and recombinant strains of *Trichoderma reesei*. In: Harman GF, Kubicek CP, editors. **Trichoderma & Gliocladium – Enzymes, biological control and commercial applications, Vol. 2**. London: Taylor & Francis, 291–309, 1998.

MARHUENDA-EGEA, F. C. & BONETE, M. J. Extreme halophilic enzymes in organic solvents. **Current Opinion in Biotechnology**, 13: 385-389, 2002.

MCKAY, A. Degradation of polygalacturonic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. **Letters in Applied Microbiology**, 11: 41-44, 1990.

MILL PJ. The pectic, enzymes of *Aspergillus niger* mercury activated endopolygalacturonase. **The Biochemical Journal**, 99:557-561, 1966a.

MILL PJ. The peptic enzymes of *Aspergillus niger* : a second exopolygalacturonase. **The Biochemical Journal**, 99:562-565, 1966b.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31: 426 – 429, 1959.

MOHAMED, S. A., FARID, N. M., HOSSINY, E. N., BASSUINY, R. I. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichoderma harzianum*. **Journal of Biotechnology**, 27(1): 54-64, 2006.

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

MONTEIL, M. D., HERNADEZ, M., RODRIGUEZ, J., ARIAS, M. E. Evaluation of an endo- β -mannanase produced by *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 for the biobleaching of pine kraft pulp. **Applied Microbiology and Biotechnology** 58: 67-72, 2002.

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 Journal of Food Microbiology**, 85: 87– 100, 2003.

MURAD, H.A. & FODA M.S. Production of yeast polygalacturonase in dairy wastes. **Bioresource Technology**, 41: 247-250, 1992.

NAGAI M., KATSURAGI T., TERASHITA T., YOSHIKAWA K., SAKAI T. Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Asperigllus awamori*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 64:1729-1732, 2000.

NAGEL, C. W.; ANDERSON, M. M. Action of a bacterial transeliminase on normal and unsaturated oligogalacturonic acids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 112, 322-330, 1965.

NIGAM, P. & SINGH, D. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. **Journal of Basic Microbiology**, vol. 34 (6), 405-423, 1994.

NITURE, S.K., PANT, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. **Microbiological Research**, 159: 305–314, 2004.

NORTHCOTE, D. H., GOULDING K. J. & HORNE, R. W. The chemical composition and structure of the wall of *Chlorella pyrenoidosa*. **Biochemical Journal**, 70(3): 391-397, 1958.

NOZAKI, K., MIYAIRI, K., HOZUMI, S., FUKUI, Y., OKUNO, Novel exopolysaccharides produced by *Alternaria mali*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 61: 75–80, 1997.

O'FARREL, P. Z., GOODMAN, H. M., O'FARREL, P. H. High resolution two dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. **Cell**, 12: 1133-1142, 1977.

ONYSKO, K. A. Biological bleaching of chemical pulps: a review. **Biotechnology Advances**, 11: 179-198, 1993.

PANDEY, A., ASHAKUMARY, L., SELVAKUMAR, P., VIJAYALAKSHRNI, K. S. Influence of water activity of *Aspergillus niger* for glucoamylase production in solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 10: 485-486, 1994.

PARDO, C., LAPEÑA, M.A. & GACTO, M. Purification and characterization of an extracellular exopolysaccharide from *Geotrichum lactis*. **Canadian Journal of Microbiology**, 37: 974-977, 1991.

PELCZAR, M. J. J., REID, R., CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: Makron Books, 1996.

PETRUCCIOLI, M., MONTELEONE, E., FEDERICI, F. Optimization of poligalacturonase production by *Aureobasidium pullulans* on orange peel waste. **Yeast**, 15: 157-162, 1989.

PICCOLI-VALLE, R. H., PASSOS, F. M. L., PASSOS, F. J. V., SILVA, D. O. **Brazilian Journal of Microbiology**, 32: 135, 2001.

PITT, M., Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. In: **Methods Enzymology**, 161, 350:354, 1988.

POLIZELI, M. L. T. M., RIZZATTI, A. C. S., MONTI, R., TERENCEZI, H. F., JORGE, J. A., AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 67: 577-591, 2005.

POLIZELI, M. L. T. M., JORGE, J. A. & TERENCEI, H. F. Effect of the carbon source on the β -glucosidase system of the thermophilic fungus *Humicola grisea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 12, 297-299, 1996.

POLIZELI, M.L.T.M.; JORGE, J.A. & TERENCEI, H.F. Pectinase production by *Neurospora crassa*: Purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. **The Journal of General and Applied Microbiology**, 137: 1815-1824, 1991.

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.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Journal of Biotechnology**, 01: 175-188, 1998.

REBECK, H. Processing of citrus juices. In: Hick, D. (Ed.), **Production and Packaging of Non-Carbohydrate Fruit Juices and Fruit Beverages**. Van Nosrand Reinhold, New York, 1990.

REESE ET, MANDELS M. Rolling with the time: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase. **Annual Report of Fermentation Processes**, 7: 1–20, 1984.

REESE ET. History of the cellulase program at the US Army Natick development centre. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, 6: 9–20, 1976.

RIDLEY, B. L., O'NEIL, M. A., & MOHNEN, D. Pectins: Structure. Biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, 57(6): 929-967, 2001.

RINALDO, M. **Physicochemical properties of pectins in solution and in gel states**. London: Elsevier, 1996.

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

ROELOFSEN, P. A. Polygalacturonase activity in yeast, *Neurospora* and tomato extract. **Biochimica et Biophysica Acta**, 10: 410-413, 1953.

RUBINGH, D. N. Protein engineering from a bioindustrial point of view. **Current Opinion of Biotechnology**, 8: 417-422, 1997.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E.J. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Advanced in Applied Microbiology**, 39: 213-94, 1993.

SAKAMOTO, T., BONNIN, E., QUEMERNER, B., THIBAUT, J.-F., 2002. Purification and characterization of two exo-polygalacturonases from *Aspergillus niger* able to degrade xylogalacturonan and acetylated homogalacturonan. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1572: 10–18, 2002.

SAMSON, R.A. *Paecilomyces* and some allied *Hyphomycetes*. **Studies in Mycology**, 6: 119, 1974.

SANTOS, A. S. R. **Biodiversidade, bioprospecção, conhecimento tradicional e o futuro da vida.** [on line]. URL: <http://www.revista.unicamp.br/infotec/artigos/silveira.html>. Consultado em 07/11/07, 2002.

SATHYANARAYANA, N. G., PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. **Process Biochemistry**, 38: 987-996, 2003.

SAWADA, K., UEDA, M. Enzyme processing of textiles in reverse micellar solution. **Journal of Biotechnology**, 89: 263-269, 2001.

SCHOLS, H., GERAEDS, C., SEARLE-VAN-LEEUEWEN, M., KOMELINK, F., VORAGEN, A. Rhamnogalacturonase: A novel enzyme that degrades the hairy region of pectins. **Carbohydrate Research**, 206: 105-115, 1990.

SCHWAN, R.F. & ROSE, A.H. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. **The Journal of Applied Bacteriology**, 76: 62-67, 1994.

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

SHARMA, D. C., SATHYANARAYAMA, T. A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. **Bioresource Technology**, 97(5): 727-733, 2006.

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

SILVA, W. B., PERALTA, R. M. Purification and characterization of a thermostable glucoamylase from *Aspergillus fumigatus*. **Canadian Journal of Microbiology**, 44: 493-497, 1998.

SUTHIRAK, P.; DHARMSTHITI, S.; LERTSIRI, S. Effect of glycation on stability and kinetic parameters of thermostable glucoamylase from *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, 40: 2821, 2005.

THIBAUT, J.F. *Aspergillus niger* endopolygalacturonase: 3- Action pattern on polygalacturonic acid. **Carbohydrates Polymers**, 3: 259-272, 1983.

TIEN, M., KIRK, K.T. Lignin peroxidase of *Phanerochaetes chrysosporium*. In: Wood, K., Kellogg, S. T. **Methods in Enzymology**, 161, part B, 238-249, 1988.

TORRALBA, S., RAUDASKOSKI, M., PEDREGOSA, A. M., LABORDA, F. Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology**, 144: 45-53, 1998.

TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 76(9): 4350-4354, 1979.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O. F., CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia 3ª edição**, Ed. Atheneu, pág. 49, 2002.

TREJO-HERNÁNDEZ, M. R., ORIOL, E., LOPEZ-CANALES, A., ROUSSOS, S., VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. & RAIMBAULT, M. **Micology Neotropical Applied**, 4: 49-62, 1991.

UENOJO, M., PASTORE, G. M. Pectinolytic enzymes. Industrial applications and future perspectives. **Química Nova**, vol. 30, nº 2, 2007.

VAN SANTEN, Y., BENEN, J. A. E., SCHROETER, K. H., KALK, K. H., ARMAND, S., VISSER, J., DIJKSTRA, B. W. A Crystal Structure of Endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, 274: 30474-30480, 1999.

VERDOES, J. C., PUNT, P. J., VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. Molecular genetic strain improvement for the overproduction of fungal proteins by filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 43: 195-205, 1995.

VILLAREJO, M., DAVIS, J. L., GRANET, S. Osmoregulation of alkaline phosphatase synthesis in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, 156: 975-978, 1983.

VINCKEN, J. P., SCHOLS, H. A., OOMEN, R. J., MCCANN, M. C., ULVSKOV, P., VORAGEN, A. G. If homogalacturonan were side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. **Plant Physiology**, 132(4), 1781-1789, 2003.

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

VORAGEN, A. G. J., PILNIK, W., THIBAUT, J. F., AXELOS, M. A. V., & RENARD, C. M. G. C. Pectins. **Food Polysaccharides**, pp. 287-339. New York: Marcel Dekker, 1995.

WHITAKER, J. R. Microbial pectolytic enzymes. In: **Microbial Enzymes and Biotechnology** (eds. Fogarty, W. M. and Kelly, C. T.) Elsevier Applied Science, London e New York. pp. 133-175, 1991.

WILLATS, W. G. T., KNOX, J. P., & MIKKELSEN J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, 17: 97-104, 2006.

WILLATS, W. G., MCCARTNEY, L., MACKIE, W., & KNOX J. P. Pectin: Cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, 47(1-2), 9-27, 2001.

WIMBORNE, M.P. & RICKARD, P.A.D. Pectinolytic activity of *Saccharomyces fragilis* cultured in controlled environments. **Biotechnology and Bioengineering**, 20: 231-242, 1978.

WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. Ltd John Wiley & Sons, editors. pp. 148, 1975.

ZHANG, J., BRUTON, B. D., BILES, C. L. *Fusarium solni* endopolygalacturonase from decayed muskmelon fruit: purification and characterization. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 54: 171-186, 1999.

SUMMARY

The pectinolytic enzymes are produced mostly by filamentous fungi. These enzymes may be classified as esterases (pectinesterase) and depolymerases (polygalacturonases and lyases), and they have a high potential for biotechnological use in olive oil extraction, oils recovery from fruit peel, fruit juices clarification, wine production and textile industry. The initial aim of this work was to select fungi with good production of pectinases, isolated from soil or plants of several São Paulo regions, according to the Biota program, highlighting *Paecilomyces variotii*. The best conditions for enzymatic production were standardized, using the Czapeck cultivation medium, pH 7.0, supplemented with 1.25% citric pectin as carbon source, inoculated with 10^5 spores, at 30°C, without agitation, for 5 days. The fungus grew well in a wide pH range (3.0-8.0), osmotic concentration (0-2.5% NaCl), and temperature up to 40°C, what it characterizes as a tolerant microorganism for extreme environments.

The purification process was accomplished through ionic exchange chromatography (DEAE-Fractogel) and filtration chromatography (Sephadex G-100), resulting in only one polygalacturonase form, purified 10.1-fold, with 47.2% recovery.

PAGE analysis showed that the enzyme was homogeneous and its pectinolytic activity was confirmed, staining the gel (polymerized with sodium polipectato) with ruthenium red. The exo-polygalacturonase characteristic was determined by thin layer chromatography. The exo-polygalacturonase showed molecular mass of 79.4 kDa, with pH and temperature optimum of 3.5 and 65°C, respectively. The enzyme was stable up to 50°C and at pH 3.0 to 6.0, for 24 hours. The isoelectric point and carbohydrate content were 4.37 and 25%, K_m and V_{max} values were 1.84 mg/mL and 432 μ mol of reducing sugar/min/mg protein. The

pectinolytic activity was tested in the presence of several metal ions: 1 and 10mM AgNO₃, 1mM Fe₂SO₄.4H₂O, 10mM ZnCl₂ (10mM) and 10mM AlCl₃ decreased the enzymatic activity. In the presence of miscible or immiscible organic solvents the relative enzymatic activity always kept above 70%. The exo-polygalacturonase also kept activity of 89.6% under 0.5M NaCl presents in the enzymatic reaction.

It was possible to determine by Western Blotting analysis a slight structural homology between polygalacturonases produced from *Paecilomyces variotii* and *Aspergillus niveus*.

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](#)