



**THAIS ODETE DE OLIVEIRA**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PRODUÇÃO  
DE PECTINASES POR ISOLADOS DE  
*Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries**

**LAVRAS - MG**

**2011**

**THAIS ODETE DE OLIVEIRA**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PRODUÇÃO DE PECTINASES  
POR ISOLADOS DE *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Carlos José Pimenta

**LAVRAS - MG**

**2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Oliveira, Thais Odete de.

Identificação molecular e produção de pectinases por isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries / Thais Odete de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2011.

137 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Carlos José Pimenta.

Bibliografia.

1. *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. 2. Pectinases.  
3. Resíduo agroindustrial. 4. Padrões genéticos. 5. RAPD. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 660.634

**THAIS ODETE DE OLIVEIRA**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E PRODUÇÃO DE PECTINASES  
POR ISOLADOS DE *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 05 de agosto de 2011.

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza                      EPAMIG

Dr. Marcelo Ribeiro Malta                                      EPAMIG

Dr. Carlos José Pimenta

Orientador

**LAVRAS - MG**

**2011**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as bênçãos derramadas sobre a minha vida, por me dar paciência e caminhar comigo sempre.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao prof. Dr. Carlos José Pimenta pela orientação, confiança e credibilidade durante a realização do Mestrado.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Gomes Cardoso pela orientação, amizade e liberdade.

Às prof<sup>a</sup> Sara Maria Chalfoun e Maria Emília por todo apoio e auxílio.

À prof<sup>a</sup> Sabrina Bastos Carvalho por toda atenção e auxílio durante a condução do experimento, contribuindo para a realização desse trabalho.

Às laboratoristas Tina, Flávia e Vicentina pelo carinho, amizade e auxílio na realização das análises laboratoriais.

Ao laboratorista Lamartine e ao pessoal do Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da UFLA pelo auxílio na condução das análises moleculares.

Ao Luís Felipe pelo auxílio nas análises experimentais.

À Heloísa e Iábita Fabiana pelo auxílio nas análises estatísticas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior \_ CAPES e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café \_ INCT pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais \_ FAPEMIG pelo auxílio neste projeto com materiais e reagentes.

Ao Pólo de Ciência e Tecnologia do Café.

À todos os funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos e da EPAMIG pela amizade.

Aos meus familiares, pelo amor incondicional, pelo apoio e incentivo e por se lembrarem de mim sempre em suas orações.

À amiga Ana Paula Fernandes pelo carinho, conselhos e principalmente por me escutar, todas as vezes que precisei.

Aos amigos Carol, Lucas, Amanda, Fernanda, Angélica, Aline e Kedma por estarem sempre presentes nos momentos de alegria e tristeza. Enfim, a todos aqueles que acreditaram no meu potencial e que de alguma forma contribuíram para meu crescimento profissional.

## RESUMO

O mercado de enzimas tem crescido consideravelmente nos últimos anos. Tais enzimas desempenham papel importante em diversos segmentos industriais, principalmente no ramo alimentício. Atenção especial vem sendo dada à busca de soluções alternativas que reduzam os custos de produção e o desenvolvimento de processos que não venham a agredir o ambiente. O descarte de resíduos é um dos grandes problemas enfrentados por diversos segmentos agroindustriais, já que estes representam um grande potencial poluidor, além de perda de biomassa e nutrientes de alto valor. Esses resíduos podem ser utilizados como fonte de carbono por microrganismos em diversos processos fermentativos, para a obtenção de produtos de alto valor agregado, tais como enzimas. As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam substâncias pectínicas, as quais podem ser despolimerizantes ou desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras. Preparações comerciais geralmente incluem um “pool” dessas enzimas, as quais têm sido aplicadas em diferentes processos industriais, principalmente na clarificação de sucos. Os fungos têm sido extensivamente estudados quanto à produção de pectinases, por se adaptarem a uma série de substratos incluindo resíduos agrícolas e agroindustriais. Diversos trabalhos relatam o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries como um bom produtor dessas enzimas, entretanto, o estudo de parâmetros tais como pH, temperatura, aeração, condições de cultivo, tipo de fermentação, escolha da linhagem e conhecimento dos padrões genéticos é de particular importância na eficiência do processo. O uso de marcadores moleculares tais como o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) tem auxiliado na identificação de isolados fúngicos. Essa técnica mostrou-se eficiente na análise de variabilidade genética e identificação de isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries pelo seqüenciamento da região ITS do rDNA. Os diferentes substratos avaliados permitiram o crescimento e a síntese de enzimas do complexo pectinolítico pelos isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries os quais resultaram em diferentes índices enzimáticos.

Palavras-chave: *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. Pectinases. Resíduo agroindustrial. Padrões genéticos. RAPD.

## ABSTRACT

The enzymes market has grown considerably in recent years. These enzymes play an important role in various industries, mainly in the food industry. Special attention has been given to the search for alternatives that reduce production costs and developing processes that will not harm the environment. Disposal of waste is a major problem faced by many agribusiness segments, as these represent a major potential pollution, and loss of biomass and nutrients of high value. These residues can be used as carbon source by many microorganisms in fermentation processes to obtain products of high added value, such as enzymes. The pectinases are a group of enzymes that degrade pectic substances, which can be despolimerizantes or desesterificantes and are produced by plants, filamentous fungi, bacteria and yeast. Commercial preparations usually include a "pool" of these enzymes, which have been applied in different industrial processes, especially in the clarification of juices. The fungi have been extensively studied for the production of pectinases by adapting to a variety of substrates including agricultural and agribusiness. Several studies have reported the fungus *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries as a good producer of these enzymes, however, the study of parameters such as pH, temperature, aeration, culture conditions, type of fermentation, choice of strain and knowledge of genetic patterns is of particular importance in the efficiency process. The use of molecular markers such as RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) has assisted in the identification of fungal isolates. This technique was efficient in the analysis of genetic variability and identification of isolates *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries by sequencing the rDNA ITS region. The substrates evaluated allowed the growth and the synthesis of pectinase by isolates of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries which resulted in different enzyme levels.

Keywords: *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. Pectinase. Agroindustrial residue. Genetic patterns. RAPD.

## SUMÁRIO

|              |  |    |
|--------------|--|----|
|              | <b>CAPÍTULO 1</b> .....  | 11 |
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....  | 12 |
| <b>2</b>     | <b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....   | 14 |
| <b>2.1</b>   | <i>Cladosporium cladosporioides</i> .....  | 14 |
| <b>2.2</b>   | Uso de marcadores moleculares na identificação de fungos .....   | 18 |
| <b>2.3</b>   | Substâncias pécnicas.....  | 21 |
| <b>2.4</b>   | Enzimas pectinolíticas.....  | 23 |
| <b>2.4.1</b> | Pectina metil esterase (PME).....  | 25 |
| <b>2.4.2</b> | Pectina liase (PL).....  | 27 |
| <b>2.4.3</b> | Poligalacutoronases (PG).....  | 30 |
| <b>2.5</b>   | Enzimas pectinolíticas na indústria de alimentos .....   | 34 |
| <b>2.6</b>   | Utilização de resíduos em processos fermentativos .....  | 36 |
| <b>2.7</b>   | Produção de enzimas pectinólíticas por microrganismos .....  | 41 |
| <b>2.7.1</b> | Características gerais do meio de fermentação .....  | 44 |
| <b>2.7.2</b> | Fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS).....  | 48 |
|              | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 54 |
|              | <b>CAPÍTULO 2 Identificação molecular de isolados de <i>Cladosporium Cladosporioides (Fres.) de Vries</i></b> .....  | 68 |
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 71 |
| <b>2</b>     | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 74 |
| <b>2.1</b>   | Instalação do experimento .....  | 74 |
| <b>2.2</b>   | Condições de cultivo .....   | 74 |
| <b>2.3</b>   | Extração de DNA.....   | 75 |
| <b>2.4</b>   | Análise qualitativa do DNA.....  | 76 |
| <b>2.5</b>   | Amplificação da região ITS do rDNA .....   | 76 |
| <b>2.6</b>   | Purificação do fragmento amplificado .....   | 77 |
| <b>2.7</b>   | Amplificação do DNA total por RAPD.....  | 77 |
| <b>2.8</b>   | Sequenciamento da região ITS.....  | 78 |
| <b>3</b>     | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 79 |
| <b>3.1</b>   | Análise do DNA genômico dos seis isolados do <i>Cladosporium cladosporioides (Fres.) de Vries</i> .....  | 79 |
| <b>3.2</b>   | Análise dos produtos de amplificação da região ITS do rDNA... ..   | 80 |
| <b>3.3</b>   | Análise dos fragmentos purificados da região ITS do rDNA .....   | 81 |
| <b>3.4</b>   | Análise da variabilidade genética do DNA genômico amplificado dos isolados de <i>Cladosporium cladosporioides (Fres.) de Vries</i> pela técnica de RAPD..... | 83 |
| <b>4</b>     | <b>CONCLUSÕES</b> .....  | 90 |
|              | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 91 |

|                |   |   |     |
|----------------|---|---|-----|
|                | <b>CAPÍTULO 3</b>   | <b>Produção de pectinases por isolados de</b>                     |     |
|                |   | <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries .....        | 95  |
| <b>1</b>       | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   |   | 98  |
| <b>2</b>       | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....  |   | 101 |
| <b>2.1</b>     | <b>Caracterização dos substratos utilizados no meio de</b>                    | <b>fermentação</b> .....  | 101 |
| <b>2.1.1</b>   | <b>Instalação do experimento</b> .....  |   | 101 |
| <b>2.1.2</b>   | <b>Metodologias analíticas para os substratos</b> .....                       |   | 101 |
| <b>2.1.2.1</b> | <b>Umidade</b> .....  |   | 101 |
| <b>2.1.2.2</b> | <b>Extrato etéreo</b> .....   |   | 102 |
| <b>2.1.2.3</b> | <b>Proteína bruta</b> .....   |   | 102 |
| <b>2.1.2.4</b> | <b>Fibra bruta</b> .....  |   | 102 |
| <b>2.1.2.5</b> | <b>Resíduo mineral fixo</b> .....   |   | 102 |
| <b>2.1.2.6</b> | <b>Determinação de açúcares totais</b> .....                                  |   | 102 |
| <b>2.1.2.7</b> | <b>Determinação de pectinas total e solúvel</b> .....                         |   | 103 |
| <b>2.2</b>     | <b>Produção de enzimas e determinação da atividade enzimática</b> ..          |   | 103 |
| <b>2.2.1</b>   | <b>Instalação do experimento</b> .....  |   | 103 |
| <b>2.2.2</b>   | <b>Microrganismo e condições de cultivo</b> .....                             |   | 103 |
| <b>2.2.2.1</b> | <b>Fermentação submersa</b> .....   |   | 103 |
| <b>2.2.3</b>   | <b>Padronização da concentração de inóculo</b> .....                          |   | 105 |
| <b>2.2.4</b>   | <b>Obtenção do extrato enzimático bruto</b> .....                             |   | 106 |
| <b>2.2.5</b>   | <b>Determinação da atividade de pectinases</b> .....                          |   | 107 |
| <b>2.2.5.1</b> | <b>Pectinametilesterase (PME)</b> .....                                       |   | 107 |
| <b>2.2.5.2</b> | <b>Pectina liase (PL)</b> .....   |   | 108 |
| <b>2.2.5.3</b> | <b>Exo-poligalacturonase (Exo-PG)</b> .....                                   |   | 108 |
| <b>2.2.5.4</b> | <b>Endo-poligalacturonase (Endo-PG)</b> .....                                 |   | 109 |
| <b>2.2.6</b>   | <b>Determinação de proteínas totais na amostra</b> ( <i>Microanálise</i> ) .. |   | 110 |
| <b>2.2.7</b>   | <b>Determinação da atividade enzimática específica</b> .....                  |   | 110 |
| <b>2.3</b>     | <b>Delineamento experimental e análise estatística</b> .....                  |   | 110 |
| <b>3</b>       | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   |   | 112 |
| <b>3.1</b>     | <b>Composição centesimal, açúcar e pectina total dos substratos</b>           | <b>utilizados no meio de fermentação</b> .....                    | 112 |
| <b>3.2</b>     | <b>Atividade pectinolítica produzida pelos isolados de</b>                    | <b><i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries</b> ..... | 115 |
| <b>3.2.1</b>   | <b>Atividade de pectinametilesterase (PME)</b> .....                          |   | 115 |
| <b>3.2.2</b>   | <b>Atividade de pectina liase (PL)</b> .....                                  |   | 118 |
| <b>3.2.3</b>   | <b>Atividade de exo-poligalacturonase (exo-PG)</b> .....                      |   | 121 |
| <b>3.2.4</b>   | <b>Atividade de endo-poligalacturonase (endo-PG)</b> .....                    |   | 123 |
| <b>4</b>       | <b>CONCLUSÕES</b> .....   |   | 127 |
|                | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....   |   | 129 |
|                | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  |   | 130 |

|                   |   |            |
|-------------------|---|------------|
| <b>APÊNDICE A</b> | <b>Análise de variância (Anava) da atividade enzimática específica de pectinases produzidas por isolados de <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries.....</b> | <b>134</b> |
|-------------------|---|------------|

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A tecnologia enzimática é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Os processos industriais biocatalisados apresentam menor impacto ambiental e também menor consumo energético, uma vez que as enzimas são biodegradáveis e altamente específicas, minimizando efeitos indesejáveis. Além disso, podem ser usadas para substituir produtos químicos que agredem o meio ambiente (BON, 2002; MITIDIERI et al., 2002).

A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de microrganismos, de plantas ou células animais representam os métodos tradicionais de descoberta de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial. Os microrganismos neste caso são de particular interesse devido ao curto período de geração, à grande diversidade de processos metabólicos e enzimas envolvidas, não havendo um número limitado de microrganismos na natureza que possam ser testados, os quais são bastante diferentes entre si. Microrganismos isolados em território brasileiro têm demonstrado excelente potencial biocatalisador frente a diferentes substratos orgânicos de interesse (CARVALHO, et al., 2005).

Os processos fermentativos que empregam a utilização de resíduos agroindustriais constituem um dos métodos mais utilizados para a produção de enzimas, pelo qual os microrganismos retiram do meio em que estão acondicionados, o material necessário para a sua subsistência, e ao mesmo tempo liberam no meio, substâncias que poderão ser empregadas em processos industriais. Dentre os processos fermentativos utilizados, têm-se a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido (FEITOSA, 2009). No presente trabalho utilizou-se a fermentação submersa, caracterizada por um meio de

cultivo líquido com diferentes resíduos agroindustriais tais como casca de café, laranja, maracujá e uva, os quais foram utilizados como fonte de pectina.

Para disponibilização dessas enzimas à indústria é necessário a obtenção de isolados com alta produção enzimática, sendo necessário, além de estudos fisiológicos, desenvolvimento de estudos genéticos que possibilitem o melhoramento de linhagens selecionadas (FINCHAM, 1989). Vários recursos são utilizados para identificação e caracterização de fungos. Todos os aspectos devem ser levados em consideração, incluindo os morfológicos, os fisiológicos e os comportamentais, como virulência, taxa de crescimento e produção de conídios, permitindo assim uma melhor discriminação de isolados (LEAL, 1996; ALVES et al., 1998).

Com os avanços na biologia molecular, modernas e poderosas técnicas moleculares surgiram. Entre elas, a PCR (*Polimerase Chain Reaction*) que têm contribuído para a detecção da variabilidade genética em diversos organismos, principalmente entre fungos. Com base nos princípios Williams *et al.* (1990) descreveram um nova técnica de marcadores moleculares, baseada na amplificação, que não requer conhecimento prévio da seqüência alvo do DNA. Esta técnica chamada RAPD (*Random Amplified Polymorphic*) tem aplicação bastante variada, como mapeamento genético, verificação da variabilidade genética, estudos de taxonomia, entre outras, e tem sido muito utilizada no estudo da variabilidade ou polimorfismo genético e na caracterização de linhagens de fungos de uma mesma espécie (PIRES, 2002).

O presente trabalho foi dividido em dois ensaios distintos. O primeiro ensaio constituiu-se na identificação molecular de isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, baseada em marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Já o segundo ensaio teve por objetivo avaliar o potencial de produção de enzimas do complexo pectinolítico por esses isolados.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Cladosporium cladosporioides*

O fungo *Cladosporium cladosporioides* é um dos fungos mais comuns, com ocorrência registrada em todas as partes do mundo sendo encontrado como saprófita, contaminante do ar e alimentos, com função biológica importante na decomposição de matéria orgânica sendo também forte competidor com outros microrganismos (SAMSON et al., 2000).

É um fungo entomopatogênico de ocorrência natural, também usado amplamente no controle biológico de diversas espécies de insetos. É considerado um fungo endofítico, vive no interior dos grãos sem causar danos aos mesmos e está largamente disseminado no ar e na matéria orgânica (OLIVEIRA et al., 2004). De acordo com Paula (2001), microrganismos endofíticos são, principalmente, fungos e bactérias que ocorrem no tecido interno das plantas, especialmente em suas partes aéreas, e não produzem qualquer efeito patogênico detectável nas plantas; ao contrário, possuem relação simbiótica, de que os dois organismos se beneficiam.

As características distintivas que mais auxiliam na identificação dessa espécie são a cicatriz proeminente nos conídios, conidióforos sem nódulos, conídios sem septos ou com apenas um septo e, principalmente, o formato do conídio elipsoidal ou limoniforme (Figura 1) e as colônias se apresentam com coloração verde-oliva até marrom-esverdeado e textura aveludada (Figura 2). É facilmente isolado de solo, fruto, folhas e grãos do cafeeiro (PEREIRA et al., 2005).

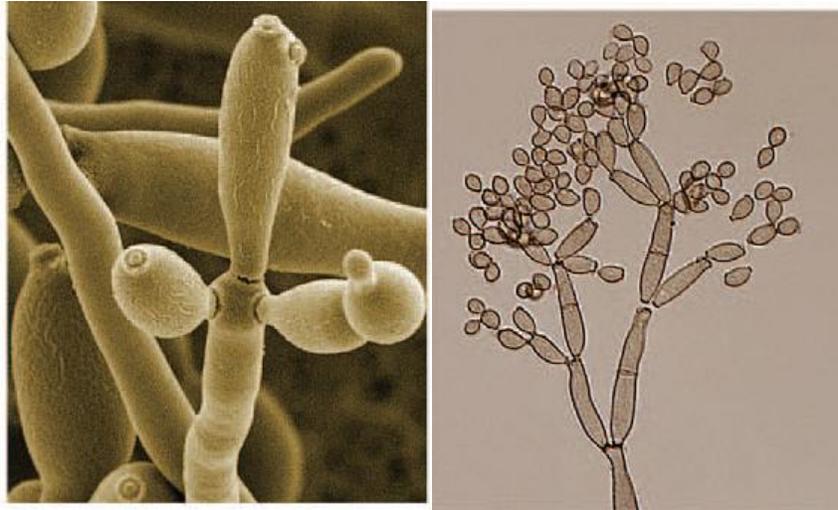


Figura 1 Características morfológicas de *Cladosporium cladosporioides*  
Fonte: Adaptado de *Studies in Mycology* (2010)

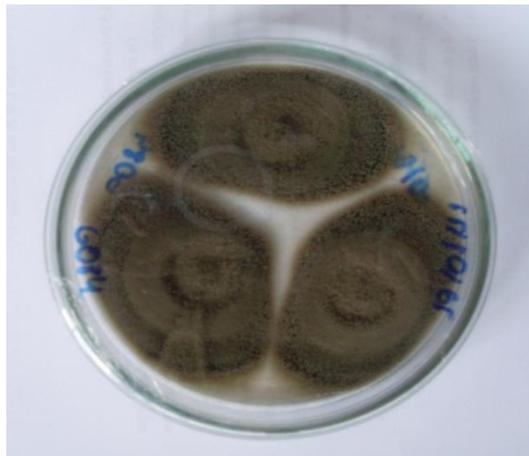


Figura 2 *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries  
Fonte: do autor

A dinâmica de *Cladosporium cladosporioides* é típica dos fungos saprófitas. Externamente, o fungo ocorre sobre o fruto durante todas as fases do desenvolvimento. Inicialmente, nos meses de outubro até março, com os frutos nos estágios de chumbinho até verde-cana, esta colonização é menos intensa,

não excedendo 25% dos frutos. Este fato se deve principalmente à presença de produtos fenólicos no fruto, como o tanino que apresenta ação fungitóxica. A partir do mês de abril a colonização começa a se acentuar atingindo o índice máximo nos meses de maio e junho, quando o café já se encontra em estado de maturação avançado, chamado cereja (PIMENTA, 1995).

Pereira (2006) relatou a presença de *Cladosporium cladosporioides*, colonizando principalmente os frutos do tipo cereja, com frequência de 7% e 14% dos grãos, nos anos de 2002 e 2003, respectivamente, não havendo diferença significativa entre esses os dois anos. Já Alves e Castro (1998) isolaram fungos presentes nas fases de maturação de cafés cultivados na cidade de Lavras, Minas Gerais e observaram uma rápida colonização dos tecidos por *Cladosporium* sp em frutos injuriados. O gênero *Cladosporium* foi isolado em todas as fases, porém com maior incidência nas fases passa e seco no pé.

O fungo *Cladosporium* sp. tem sido relatado associado a cafés de boa qualidade em várias regiões, o que despertou o interesse para o seu uso como agente antagonista aos fungos deletérios a qualidade do café (PEREIRA et al., 2001). Um provável mecanismo de ação de *Cladosporium* seria um consumo muito rápido do substrato presente no fruto (mucilagem), impedindo ou amenizando o estabelecimento de outros fungos. Esta ação impediria, então, a ocorrência de fermentações indesejáveis como a butírica e propiônica devido à falta de substrato (PEREIRA, 2002). Alves (1996) sugere também que a ação do *Cladosporium* pode estar associada à produção de compostos benéficos a qualidade da bebida.

Em trabalhos realizados por Alves (1996) sobre a relação entre a população fúngica e a bebida, verificou-se uma associação entre *Cladosporium* e a bebida de boa qualidade (dura para melhor), principalmente nos cafés beneficiados das cidades de Lavras e Patrocínio, nos quais demonstrou maior incidência.

Tendo em vista o potencial de *Cladosporium cladosporioides* para o biocontrole de insetos e de fungos produtores de toxinas em grãos de café, Oliveira et al., (2004) identificaram e quantificaram a distribuição do fungo *Cladosporium cladosporioides* em amostras de solo, bem como em frutos de café na árvore e em diferentes etapas do processamento pós-colheita, nas regiões produtoras de *Coffea arabica* do Estado da Bahia. Os resultados demonstraram maior ocorrência na Região Oeste, onde se detectou sua presença em 100% das amostras de solo. Quanto aos diferentes estágios de maturação do fruto, foi verificada maior ocorrência de *C. cladosporioides* em frutos passa na planta e, quanto ao processamento, em grãos em coco.

Para Pereira et al., (2005), a dificuldade de detecção de *Cladosporium cladosporioides* nas fases iniciais de desenvolvimento dos frutos pode estar relacionada ao impedimento de sua manifestação, pela inibição dos próprios compostos do fruto, ou pela presença de outros fungos. O aumento gradual do fungo coincide com a conversão dos compostos fenólicos em açúcares facilitando a colonização interna do fruto.

Fungos deste gênero têm sido relatados ainda como bons produtores de enzimas de interesse biotecnológico (FERNANDES, 2009; BASTOS; COSTA; MENESES, 2007). Fernandes (2009) avaliando o potencial enzimático de fungos filamentosos verificou que fungos do gênero *Cladosporium* apesar de serem de mesma espécie, mas isolados de diferentes fontes, diferiram quanto ao potencial enzimático, sugerindo a existência de uma variabilidade genética entre os isolados. Os resultados demonstraram destaque para as espécies de *Cladosporium cladosporioides*. Meneses (2007) também verificou diferenças no potencial enzimático entre isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de *Vriess* para a produção das enzimas pectinolíticas poligalacturonase (PG) e pectinametilsterase (PME).

As modificações genéticas têm sido usadas para melhorar a capacidade de produção e secreção de enzimas por microrganismos (PUNT et al., 2002). A manipulação genética pode aumentar ainda a produtividade na ordem de melhorar as propriedades das enzimas, aumentar o rendimento e minimizar efeitos na produção de subprodutos indesejáveis (MEYER, 2008; HASAN et al., 2006; BENNETT, 1998 ).

## **2.2 Uso de marcadores moleculares na identificação de fungos**

Antes do advento dos marcadores moleculares, a caracterização de isolados fúngicos era restrita, principalmente, a de marcadores morfológicos. A caracterização morfológica como textura, pigmentação, velocidade de crescimento da colônia e produção de estruturas típicas, embora útil, é bastante limitada devido ao baixo número de caracteres passíveis de serem analisados. Além disso, não permite definir as relações entre as espécies do mesmo gênero, uma vez que os marcadores morfológicos variam conforme as condições ambientais tais como composição do meio utilizado e condições de incubação, apresentando limitações quanto ao seu uso eficiente. Podem ainda ser subjetivos, pouco conclusivos e podem induzir a erros de interpretação quanto à identificação das espécies em estudo, já que, muitas vezes, colônias atípicas de um dos organismos podem assemelhar-se às colônias do outro (FUNGARO, 2004; URBEN & OLIVEIRA, 1999; BURGESS et al., 1995).

Entretanto, técnicas moleculares baseadas na análise de fragmentos de DNA possibilitam a rápida detecção de marcadores moleculares no estudo da variabilidade genética, tanto para caracteres qualitativos quanto quantitativos (GOUVEIA, 2004; BRAMMER, 2000). Os marcadores moleculares surgiram devido à necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA (GOUVEIA, 2004). Um marcador molecular é definido como *qualquer*

*fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA* (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Milach (1998) descreve que *marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente*.

Para Anchorena-Matienzo (2002) os marcadores moleculares apresentam certas vantagens sobre os marcadores morfológicos por fornecerem um número ilimitado de marcas distribuídas aleatoriamente ao longo de todo o genoma e também por serem independentes dos efeitos ambientais permitindo a identificação precisa dos genótipos.

O marcador RAPD é um dos tipos mais utilizados, sendo um tipo especial de PCR utilizado para detecção de polimorfismo genético, representado pelas diferenças em número ou comprimento das bandas entre isolados, decorrentes da diferença em número e localização de sítios de ligação no DNA (SWENSEN, 1995). Além disso, esses marcadores não requerem *primers* espécie específicos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Tais polimorfismos são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado em um dos genomas em relação à ausência destes mesmos fragmentos em outro (LIMA *et al.*, 2008).

Perfis de RAPD de representantes de vários gêneros podem conter bandas comuns a um outro gênero, enquanto outras bandas podem ser exclusivas. Se várias espécies pertencentes a este gênero forem analisadas e uma das bandas exclusivas do gênero estiver presente em todas elas, pode-se concluir que esta banda é um marcador específico do gênero. Da mesma forma, quando se tem um perfil de RAPD de espécies de um mesmo gênero, algumas bandas poderão ser compartilhadas por algumas espécies, enquanto outras poderão ser exclusivas de uma dada espécie (FUNGARO & VIEIRA, 1998).

As técnicas moleculares vêm se tornando de grande auxílio na taxonomia, através de sequenciamento de regiões conservadas, como aquelas

presentes nos nucleotídeos das regiões internas transcritas (ITS) do DNA ribossomal (rDNA) (ROSA *et al.*, 2006). Uma técnica muito utilizada para taxonomia de fungos é a amplificação da região ITS do rDNA por PCR (MENEZES *et al.*, 2010). As regiões ITS evoluem rapidamente sendo apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O fato de essas regiões aparecerem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade (MORRICA *et al.*, 1998).

A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) tem sido usada na detecção de variabilidade genética ou polimorfismo genético em organismos (ARAÚJO *et al.*, 2003). A utilização do marcador molecular RAPD, apesar de apresentar algumas limitações, tem-se mostrado útil nos estudos de microrganismos, os quais não se têm muita informação genética, além de ser um método simples e rápido e que necessita de pequenas quantidades de DNA para dar início ao processo, revelando um grande número de marcas polimórficas (LIMA *et al.*, 2008).

Para estimar os padrões de similaridade genética com o uso de marcadores moleculares, frequentemente são utilizadas técnicas multivariadas, como as análises de agrupamento e a ordenação de uma representação simplificada dos resultados. Um precursor destas análises é a construção de uma matriz de similaridade entre os genótipos que estão sendo avaliados, obtida a partir de um coeficiente de similaridade específico (DUARTE, 1998).

### 2.3 Substâncias pécticas

Substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular que formam o maior componente da lamela média, uma fina camada de material adesivo extracelular entre as paredes primárias de células de vegetais superiores (UENOJO & PASTORE, 2007). A característica dominante da pectina, o principal constituinte das substâncias pécticas, é uma cadeia linear de unidades de ácido D-galacturônico na qual proporções variáveis dos grupos ácidos (40 a 60 %) estão presentes como ésteres metílicos (PRADE et al., 1999).

Como muitos polissacarídeos, a pectina é heterogênea quanto à sua estrutura química, variando de acordo com a fonte, extração e fatores ambientais. Quimicamente, a pectina é formada por uma cadeia central de algumas centenas a quase mil resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações  $\alpha$ -1,4. Ligados a esta cadeia podem ser encontrados resíduos de ramnose (Figura 3). Os grupos carboxílicos do ácido galacturônico podem ser parcialmente esterificados a grupamentos metil e parcialmente ou completamente neutralizados por sódio, potássio e amônia. A pectina apresenta ainda cadeias laterais formadas por moléculas de arabinose, galactose e xilose ligados covalentemente aos carbonos 2 e 3 dos resíduos de ácido galacturônico ou ao carbono 4 dos resíduos de ramnose (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001; GUMMANDI & PANDA, 2003).

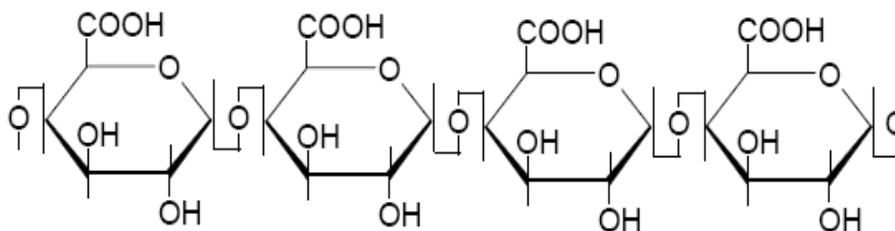


Figura 3 Estrutura primária de substâncias pécticas  
 Fonte: Adaptado de Martin (2006)

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

- a) protopectina: é o termo usado para descrever as substâncias pécticas insolúveis em água, das quais se originam as substâncias pécticas solúveis;
- b) ácido péctico: são os ácidos poligalacturônicos cujos grupos carboxílicos não apresentam esterificados com grupos metila;
- c) ácido pectínico: são os ácidos poligalacturônicos que contêm quantidades variáveis de grupos metoxílicos. Estes compostos apresentam a propriedade de formar gel na presença de açúcares e cátions divalentes;
- d) pectina: é o nome genérico de misturas pécticas que contêm ácido pectínico como maior componente.

A pectina possui um alto valor como alimento funcional sendo extensamente usada na indústria de alimentos como agente geleificante, estabilizante e como fibras nutricionais. Também é um componente abundante, onipresente e multifuncional da parede celular de todas as plantas terrestres (ALKORTA *et al.*, 1998; MALLER, 2008). Em alguns casos, entretanto, as substâncias pécticas podem representar um problema nas várias etapas de processamento de frutas e vegetais, visto que seu arraste, após o rompimento da

parede celular, pode causar turbidez em sucos ou incrustações em tubulações e reatores industriais (MARTINS, 2006). Na indústria de sucos e vinhos pode causar ainda um aumento considerável na viscosidade, dificultando os processos de prensagem filtração e subsequente concentração, diminuindo assim o rendimento da extração de sucos (SANTI, 2005).

Em razão da grande diversidade de substâncias pécticas presentes em diferentes tecidos vegetais, existem várias enzimas capazes de degradar essas substâncias, que são denominadas enzimas pectinolíticas ou pectinases (BAILEY & PESSA, 1990). A adição de enzimas pectinolíticas resulta na degradação da pectina e outros componentes de alto peso molecular, diminuindo a viscosidade e aumentando o rendimento dos sucos, ocasionando uma aparência cristalina no produto final e reduzindo em até 50% o tempo de filtração (SANTOS, 2007).

#### **2.4 Enzimas pectinolíticas**

As enzimas pectinolíticas ou pectinases formam um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas. Podem ser produzidas, em diferentes combinações, por plantas e por microrganismos, como fungos, leveduras e bactérias (SANTOS *et al.*, 2008). São aplicadas nas indústrias de alimentos no amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras, enriquecimento protéico de alimentos infantis e extração de óleos (UENOJO & PASTORE, 2007).

Embora a pectina apresente outros açúcares em sua composição, o termo enzimas pectinolíticas, ou pectinases, refere-se ao grupo de enzimas que agem sobre os resíduos de ácido galacturônico. Devido à presença de várias formas de

pectina na parede celular das plantas, são necessárias pectinas com diferentes formas de ação para sua degradação (GUMMANDI & PANDA, 2003). Tais enzimas podem ser induzidas por substratos pécnicos ou produzidas constitutivamente, dependendo do organismo estudado (MALDONADO & STRASSER de SAAD, 1998). Nos processos industriais, as diferentes formas de ação das enzimas pectinolíticas sobre as substâncias pécnicas são um parâmetro importante para conduzir ao aproveitamento total da capacidade catalítica das mesmas (ROCHA, 2010).

A biodegradação eficiente da pectina requer uma larga escala de enzimas, incluindo tanto as que agem na cadeia principal como as que agem nas cadeias laterais (VRIES et al., 2002). As principais enzimas pectinolíticas sintetizadas por fungos são a poligalacturonase, pectinesterase e pectina liase, sendo subdivididas, com base na ação sobre substâncias pécnicas em dois grupos: pectinases despolimerizantes e pectinases desesterificantes (CAMARGO et al., 2005). As enzimas desmetoxilantes agem removendo grupos metil da cadeia principal, enquanto as enzimas despolimerizantes rompem ligações  $\alpha$ -1,4 entre monômeros de ácido galacturônico, tanto por hidrólise (hidrolases) quanto por trans-eliminação (liases) (SANTI, 2005) (Quadro 1).

A pectinametilesterase e a poligalacturonase são enzimas do grupo das hidrolases, enquanto pectina liase compõe o segundo grupo, e agem diferentemente sobre o polímero de pectina. A pectinametilesterase atua especificamente sobre a molécula de pectina e a poligalacturonase age sobre o ácido poligalacturônico hidrolisando ligações glicosídicas  $\alpha$  -1,4, enquanto a pectina liase tem ação sobre a molécula de pectina altamente ramificada (BUENO et al., 2005). As hidrolases, denominadas poligalacturonases são subdivididas, quanto ao mecanismo de ação sobre a cadeia de pectato, podendo, neste caso, atuar de forma randômica (atividade endo) ou a partir da extremidade não redutora da molécula (atividade exo) (SAKAI et al., 1993).

Quadro 1 Classificação das enzimas pectinolíticas

| PECTINASES DESPOLIMERIZANTES |  |                        |
|------------------------------|--|------------------------|
| Enzima                       | Modo de ação   | Substrato preferencial |
| Poligalacturonase (PG)       | hidrólise de ligações $\alpha$ -1,4 endo-PG ou exo-PG 1 (monômeros) e exo-PG 2 (dímeros) | Ácido Pécico           |
| Polimetilgalacturonase (PMG) | hidrólise endo-PMG ou exo-PMG  | Pectina                |
| Pectina liase (PL)           | trans-eliminação endo-PL ou exo-PL   | Pectina                |
| Pectato liase (PAL)          | trans-eliminação endo-PL ou exo-PL   | Ácido pécico           |
| PECTINASE DESMETOXILANTE     |  |                        |
| Pectinametilsterase (PME)    | desesterificação de grupos metil   | Pectina                |

Fonte: Alkorta et al., 1998; Kashyap et al., 2001

#### 2.4.1 Pectina metil esterase (PME)

As pectinametilsterases (PME) desesterificam a pectina por hidrólise, removendo os grupos metoxílicos da molécula de pectina e de ácido pectínico resultando na formação de ácido pécico (GAVA, 1998). Durante a reação ocorre a quebra da molécula da água e a adição de um hidrogênio a um carbono da ligação e adição do grupo hidroxila a outro carbono, produzindo metanol e pectina com baixo grau de metoxilação (TRIBESS, 2003) (Figura 4).

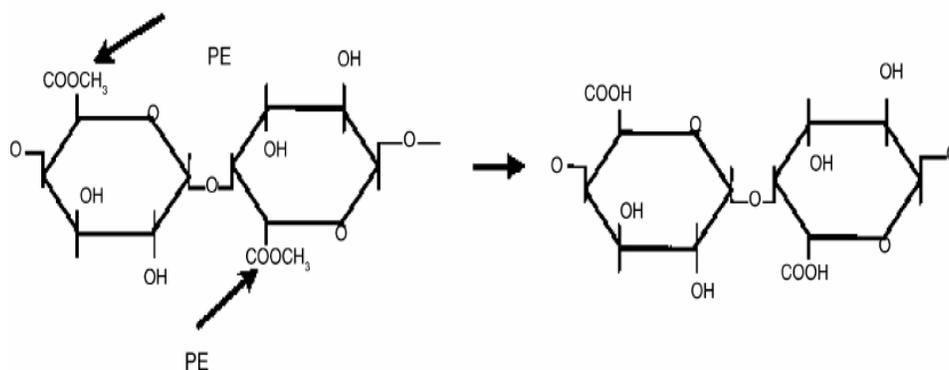


Figura 4 Modo de ação da pectinametilesterase  
 Fonte: Sathyanarayana & Panda, 2003

De acordo com Uenojo e Pastore (2007), a pectinaesterase age preferencialmente no grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade não esterificada, apresenta valores de pH ótimo variando de 4 a 8 e temperatura ótima de 40 a 50° C. Está presente em praticamente todas as preparações enzimáticas comerciais para proteção e melhoramento da textura e firmeza de frutas e vegetais processados e na extração e clarificação de sucos de frutas. Pode estar envolvida em mudanças das substâncias pécicas durante amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais.

A pectina desmetoxilada é chamada ácido poligalacturônico ou ácido pécico. Microrganismos podem degradar a pectina diretamente, por clivagem em oligômeros metoxilados, ou após desmetoxilação da pectina, ou mesmo, pela ação da enzima pectinaesterase (EC 3.1.1.11). A clivagem direta da pectina ou do ácido poligalacturônico pode ocorrer por hidrólise ou ação transeleminativa (TARDY et al., 1997).

A ação da pectinametilesterase (PME) tem pouco efeito sobre a viscosidade das soluções. Esta enzima atua sobre a pectina de alta metoxilação, transformando-a em pectina de baixa metoxilação, sendo, entretanto, imprescindível para a ação de outras pectinases, como as poligalacturonases,

uma vez que estas atuam sobre a pectina de baixa metoxilação (SANTI, 2005). De acordo com Braverman (1963) a atuação da pectinametilesterase desmetilando as pectinas faz-se necessária, uma vez que a poligalacturonase torna-se inativa na presença de grupos metílicos. Entretanto, de acordo com Pereira (2005), ação da enzima PME sobre a molécula de pectina, libera metanol que é um componente tóxico.

Meneses (2007), avaliando a produção de enzimas pectinolíticas por isolados de *Cladosporium cladosporioides*, verificou que o isolado G088 apresentou atividade média superior aos demais para a produção de PME em todos os tempos de cultivo, indicando que o mesmo é um bom produtor dessas enzimas, já que nas mesmas condições de cultivo, proporcionou oito vezes mais atividade de PME que o *Aspergillus niger* e cerca de duas vezes maior atividade que o *Rhizopus* sp. Já Menezes et al., (2006) não encontrou resultados satisfatórios em estudos acerca da produção de pectinametilesterase (PME) por um linhagem de *Aspergillus niger* mutante utilizando resíduo de maracujá e farelo de trigo como substrato. Os resultados demonstraram que a atividade de PME não ultrapassou 1,0 U/mL.

#### **2.4.2 Pectina liase (PL)**

As liases, também chamadas transeliminases, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado e incluem as pectina liases e as pectato liases. A pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PMGL) catalisa a eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados. Quebram as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona do substrato (pectina) de modo endo- ou exo- (Figura 5). O pH ótimo é em torno de 5,53 e temperatura ótima

entre 40 e 50 °C. Já a pectato liase (poligalacturonato liase, PL) catalisa a clivagem de ligações  $\alpha$ -1,4 de ácido pécico e requerem  $\text{Ca}^{+2}$  para a atividade (UENOJO & PASTORE, 2007). De acordo com Valle et al., (2001), entre as pectinases, a pectinase liase é de particular interesse porque age diretamente sobre a pectina, sem a necessidade de uma ação anterior por outras enzimas do complexo pectinolítico.

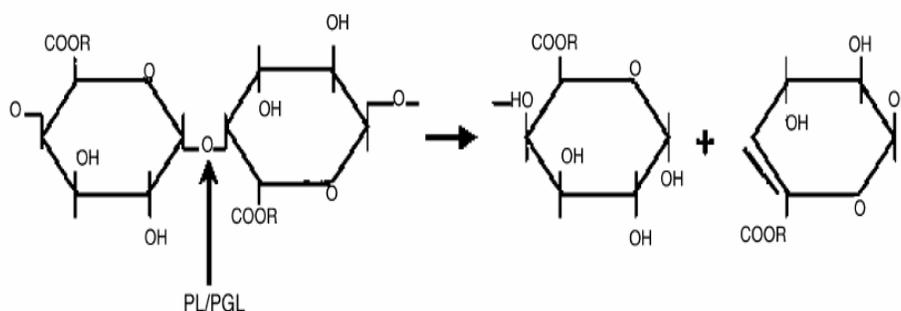


Figura 5 Modo de ação das liases  
Fonte: Sathyanarayana & Panda, 2003

As pectina liases clivam preferencialmente substratos com alta metilação, diminuindo a afinidade pelo substrato com a diminuição do grau de esterificação (REXOVÁ-BENKOVÁ & MARKOVIC, 1976). Por esta razão é a única pectinase capaz de despolimerizar, sem a ação anterior de outras enzimas, moléculas de pectina altamente esterificada, diminuindo a viscosidade e a clarificação de sucos, sem comprometer o conteúdo de ésteres voláteis responsáveis pelo aroma de várias frutas (ALÃNA *et al.*, 1990).

Trabalhos realizados por Camargo et al., (2005) sobre a produção de pectina liase a partir de *Aspergillus* sp. em meio contendo bagaço de laranja como fonte de carbono e utilizando sulfato de amônio para purificação, denotam relevância nesse tipo de estudo, já que esse substrato se mostrou como melhor indutor da síntese de pectina liase extracelular, demonstrando o alto fator de

recuperação de atividade enzimática, obtido através de metodologia simples de separação da pectina liase gerada num meio extremamente econômico, associado ao valor desta enzima para o setor alimentício. Minussi et al., (1998) com o objetivo de reduzir custos, estudou os efeitos do caldo de cana na produção de pectina liase por *Penicillium griseoroseum* e verificou que a adição de caldo ao meio de cultivo promoveu maior atividade de PL quando comparado com a adição de pectina, demonstrando que, mesmo em baixas concentrações, o caldo de cana foi capaz de induzir pectina liase em *Penicillium griseoroseum*.

O uso de pectina liase (PL) em processos industriais voltados para a produção de sucos de frutas traz vantagens em relação ao uso de outras enzimas pectinolíticas, como pectinaesterase e poligalacturonase. Estas possuem ação combinada e podem ser substituídas por PL, que realiza o trabalho das duas enzimas. A imobilização de pectina liase oferece possibilidades interessantes para aplicação em processos contínuos de tratamento do suco de fruta (SPAGNA et al., 1993).

Hermann et al., (2008), estudando a produção de pectina liase por fermentação em estado sólido por *Aspergillus awamori* e *Penicillium viridicatum*, utilizando bagaço de laranja e farelo de arroz como substrato, verificou a influência da temperatura de cultivo, umidade e a composição do meio sobre a produção da enzima. Os resultados obtidos indicaram que todas as variáveis estudadas influem na produção da enzima pectina liase para *Aspergillus awamori*, sendo a produção dessa enzima maximizada com o aumento do tempo de fermentação e da quantidade de bagaço de laranja, à temperatura de 28° C e umidade de 1:1 (p/v). De acordo com Bravo et al., (2000), dentre as pectinases produzidas por *Aspergillus*, a pectina liase é a única enzima capaz de hidrolizar, sem ação prévia de outras enzimas, pectinas altamente esterificadas, como a pectina de frutas.

### 2.4.3 Poligalacutoronases (PG)

As poligalacturonases catalisam a hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,4 entre resíduos de ácido galacturônico não esterificados. Apresentam como substratos preferenciais ácidos pécticos ou ácidos poligalacturônicos com baixo grau de esterificação. Sua ação pode-se dar internamente à cadeia principal, liberando oligômeros (endo-PG) ou na extremidade não- redutora, liberando monômeros (exo-PG) (Figura 6) (SANTI, 2005).

As endopoligalacturonases (endo-PG) hidrolisam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 internas de forma randômica, causando a despolimerização da molécula e liberando oligômeros de ácidos poligalacturônico (MARTIN, 2006). Enquanto as exo-poligalacturonases (exo-PG) catalisam a hidrólise das ligações terminais  $\alpha$ -1,4 da cadeia de ácido poligalacturônico por hidrólise. Entre as exo-PG, dois grupos podem ser diferenciados através do produto final liberado: exo-PG 1 (EC 3.2.1.67) que liberam monômeros de ácido galacturônico e exo-PG 2 (EC 3.2.1.82) que liberam dímeros (Da SILVA *et al.*, 1997). A poligalacturonase é a enzima com função hidrolítica principal. Para a maioria dos usos industriais, as poligalacturonases produzidas por fungos provam ser úteis pela alta atividade e atividade ótima em faixa de pH baixo, servindo para grande parte das aplicações em processos envolvendo frutas e vegetais (SANTOS *et al.*, 2008).

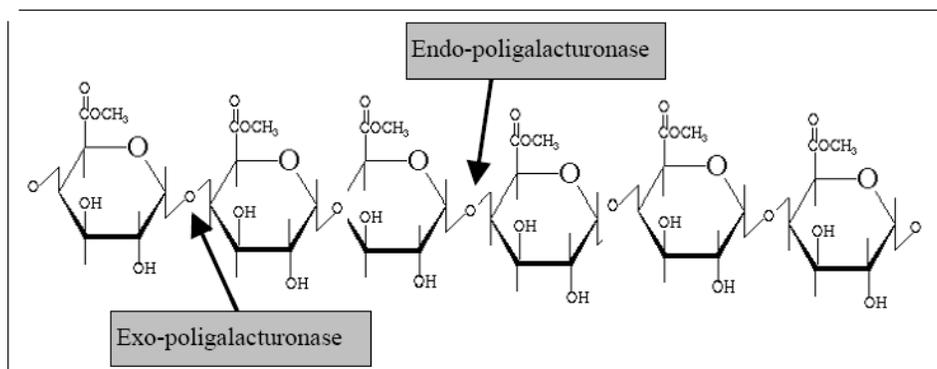


Figura 6 Modo de ação das poligalacturonases  
 Fonte: Fontana (2009)

Algumas poligalacturonases de origem fúngica têm sido purificadas e caracterizadas mostrando variação nas suas propriedades químicas e físicas. A hidrólise enzimática das substâncias pécnicas depende de fatores físico-químicos que interferem na velocidade da reação tais como, o volume de enzima no ensaio, o valor do pH, temperatura e tempo de incubação (BUENO *et al.*, 2005). As poligalacturonases fúngicas são úteis pela alta atividade enzimática e por possuírem pH ótimo de atividade na região levemente ácida e temperatura ótima entre 30 e 50 °C. Substratos típicos são resíduos agroindustriais, como cascas de frutas cítricas, bagaço de beterraba doce e extratos de farelo de trigo, por serem fontes de energia alternativa para crescimento e metabolismo e por estarem abundantemente disponíveis (UENOJO & PASTORE, 2007).

Castro *et al.*, (2009) alcançaram a produção máxima de poligalacturonase de 38,36 U.g<sup>-1</sup> em 24 horas de fermentação utilizando como agente de fermentação o fungo *Aspergillus niger* e torta de girassol como substrato. Em trabalhos realizados por Cordeiro & Martins (2009) verificou-se que a produção de poligalacturonase pelo termofílico *Bacillus* sp. cultivado em meio líquido contendo pectina cítrica como única fonte de carbono, alcançando sua máxima atividade enzimática em 30 horas, com níveis de 42 IU. mL<sup>-1</sup>. Os

resultados demonstraram que entre as várias fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio testadas, o sulfato de amônio foi a que proporcionou maior atividade da poligalacturonase e o aumento da concentração da pectina cítrica, no meio de cultura, acima de 0,5% não proporcionou um aumento da atividade da enzima.

Santos (2007) também obteve resultados satisfatórios na produção de poligalacturonase (PG), utilizando como substrato o pedúnculo de caju seco e como agente de fermentação o microrganismo *Aspergillus Níger*. Os modelos obtidos para atividade de poligalacturonase foram estatisticamente significativos com uma atividade de 15,55 U/g, sendo que o maior pico de produção da enzima foi com 30 horas de processo, o que demonstra que o resíduo do pedúnculo de caju seco é uma fonte promissora de poligalacturonase. Souza et al., (2010) alcançaram valores de 20,9 U g<sup>-1</sup> de atividade de poligalacturonase após 66 h de processo, utilizando resíduo seco de maracujá como substrato. O valor máximo de atividade de poligalacturonase encontrado por Menezes et al., (2006) utilizando este mesmo resíduo foi de 12, 01 U/mL obtido após 64 horas de fermentação.

Em trabalhos realizados por Carvalho (2007) sobre a produção de pectinases pelo agente biológico G088 demonstrou-se que o microorganismo em estudo foi capaz de produzir poligalacturonase utilizando arroz como substrato em todos os tempos de cultivo avaliados (10, 15 e 20 dias), apresentando as seguintes atividades respectivamente: 105,52; 86,58 e 32,36 nmol/g. Observa-se então aos 10 dias de cultivo, máxima produção de poligalacturonase, sendo este considerado o tempo ótimo para a produção de pectinases pelo agente biológico G088. Andrade et al., (2011), avaliando a produção de poligalacturonase por *Bacillus* sp. utilizando fermentação submersa, verificou que a produção de poligalacturonase atingiu seus valores máximos às 36 horas de fermentação, alcançando níveis de 39 U/mL, sugerindo que a produção desta enzima foi parcialmente associada ao crescimento.

Na indústria de alimentos, além da clarificação de sucos, a poligalacturonase (PG) é também utilizada para o aceleração do tempo de fermentação do grão de café, com a finalidade de despreendimento de seu pericarpo. Sendo requisitada ainda para a obtenção de aromas extraídos de vegetais previamente triturados (EVANGELISTA, 2005). Devido à característica de liberação de seus produtos, a determinação da atividade enzimática das poligalacturonases pode ser realizada pela medida da redução de viscosidade de uma solução (endo-PG) ou pelo aumento da concentração de açúcares redutores (exo-PG) (SANTI, 2005).

Martins et al., (2005), estudando o perfil enzimático produzido pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação em estado sólido e fracionamento de uma poligalacturonase (PG) verificou que a atividade máxima de exo-PG foi de 40,0 U/g, o equivalente a 5,0 U/ml com 4 dias de fermentação. Já a produção máxima de endo-PG foi de 3,6 U/g, o equivalente a 0,45 U/ml, coincidindo com o tempo de maior produção da exo-PG. Aos 10 dias de fermentação, observou-se um declínio na atividade de ambas as enzimas. Panarotto et al., (2008) avaliaram a influência de pectinas industrializadas, de diferentes procedências, e de diferentes concentrações de cascas secas de limão Taiti (*Citrus latifolia*), como indutores da produção de endo e exopoligalacturonases, por *Aspergillus niger* em cultivo em estado sólido e a influência da concentração de nutrientes adicionados ao meio. A partir dos resultados pode-se concluir que as máximas atividades foram alcançadas quando 80% de cascas secas de limão Taiti foram utilizadas, mostrando ser esta uma fonte indutora eficiente e de baixo custo. Já com relação ao aumento da concentração de nutrientes no meio, não foram observados efeitos relevantes sobre a produção de poligalacturonases.

## 2.5 Enzimas pectinolíticas na indústria de alimentos

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

As pectinases são enzimas empregadas em grande proporção em diversos segmentos industriais (KASHYAP *et al.*, 2001). Na indústria de alimentos, essas enzimas atuam na extração, clarificação e despectinização de sucos de frutas e extração de óleo vegetal, bem como na produção de alimentos para bebês e em uso simultâneo com celulases e hemicelulases no tratamento de biomassa celulósica (BRAVO *et al.*, 2000). O tratamento enzimático na fase de clarificação tem a finalidade de reduzir a viscosidade, degradar o amido residual e facilitar a floculação de substâncias insolúveis (AQUARONE *et al.*, 2001).

As pectinases também são utilizadas para reduzir o amargor excessivo em cascas de citrus, restaurar o aroma perdido durante secagem e melhorar a firmeza de pêssego e pickles processados. A infusão de pectinase e  $\beta$ -glicosidase aumenta o aroma e as substâncias voláteis de frutas e vegetais, aumenta a quantidade de agentes antioxidantes em óleo de oliva extra-virgem e reduz a indução ao ranço, além de outras aplicações (UENOJO & PASTORE, 2007).

Na indústria de vinhos, a adição de pectinases durante o esmagamento das uvas ou no mosto de vinho melhora a extração, reduz o tempo de clarificação e aumenta o conteúdo de terpenos no vinho. Preparações comerciais de pectinase com alta atividade de pectina liase e baixa atividade de pectinametilsterase são preferidas por minimizarem a liberação de metanol dos ácidos poligalacturônicos metilados durante a produção de vinho (SANTOS, 2007). Para Kashyap et al., (2001), as pectinases podem atuar tanto na clarificação do vinho branco, por degradação da pectina em suspensão, quanto na retenção de cor do vinho tinto, uma vez que a ação das mesmas facilita a liberação do pigmento da casca durante a fermentação.

De acordo com Bravo et al., (2000), na indústria têxtil, as pectinases têm sido empregadas na maceração do linho e no tratamento de fibras têxteis brutas, como a juta e o rami, e também na indústria de fermentados, como, por exemplo, na fermentação do café, chá, cacau e do fumo. A fermentação do café utilizando microrganismos pectinolíticos é usada para remover a camada de mucilagem e parte das substâncias pecticas do grão. Na produção de chás, o tratamento enzimático acelera a fermentação e melhora as propriedades dos chás em pó instantâneos, devido à degradação da pectina (BOCCAS *et al.*, 1994; JAYANI *et al.*, 2005).

Os preparados enzimáticos comerciais usados no processamento de alimentos são tradicionalmente misturas de pectina-liases, polimetil esterases e poligalacturonases, que correspondem à maior fração do complexo pectinolítico nestes produtos (SEMENOVA *et al.*, 2006). Preparações comerciais contendo pectinases são utilizadas ainda na extração de óleo de oliva, sendo adicionadas durante a prensagem das azeitonas para melhorar o processo de extração. O uso de enzimas de maceração aumenta a quantidade de agentes antioxidantes e de vitamina E em óleo de oliva extravirgem, reduz a indução ao ranço, aumenta a

extração, melhora o fracionamento na centrifugação e produz óleo com baixo teor de umidade (UENOJO & PASTORE, 2007).

Em muitos segmentos as enzimas podem substituir substâncias químicas sintéticas e contribuir para técnicas de produção ou gerar benefícios para o meio ambiente, por meio da biodegradabilidade. Outra grande vantagem em se aplicar enzimas em processos industriais seria pela sua alta especificidade e eficiência e por se fazer necessárias apenas pequenas quantidades do composto. Além disso, muitas vezes contribuem para uma produção mais sustentável, reduzindo o volume de resíduos gerados (MALLER, 2008).

## **2.6 Utilização de resíduos em processos fermentativos**

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado, ao contrário do que acontecia no passado, quando os resíduos eram dispostos de modo indevido. Atualmente, os conceitos de minimização, recuperação e aproveitamento de subprodutos estão sendo cada vez mais difundidos (SANTOS *et al.*, 2010).

Hoje é realidade constatável que a geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo. Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos quanto sólidos. Ao longo dos tempos ficou comprovado que esses resíduos podem apresentar elevados problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem muitas vezes, perda de biomassa e de nutrientes de alto valor. De uma forma particular, a bioconversão dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos está recebendo crescente atenção, uma vez que essas matérias representam recursos possíveis e utilizáveis para a síntese de produtos úteis (ROCHA, 2010).

Com o advento da inovação biotecnológica na área de enzimas e tecnologia das fermentações, novas perspectivas estão sendo criadas. Uma das aplicações em potencial desses resíduos pode ser sua utilização como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de produtos químicos e de produtos de maior valor agregado, como enzimas, álcoois, proteínas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos e compostos de aroma. Resíduos agroindustriais como casca de café, casca e bagaço de frutas cítricas, farelo de trigo, casca de maracujá, bagaço de uva, bagaço de mandioca, bagaço de beterraba doce podem ser utilizados como substratos em bioprocessos para a produção de compostos de maior valor agregado desde que se escolha o microrganismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada (UENOJO & PASTORE, 2006).

A indústria brasileira de sucos gera grandes quantidades de resíduos agroindustriais (cascas e bagaços). Estes resíduos formados principalmente de celulose e pectina, constituem-se em uma alternativa barata e vantajosa para a produção de enzimas, incluindo as pectinases (SANTI, 2005). Um dos principais problemas enfrentados pelas indústrias processadoras de suco de laranja, por exemplo, é o grande volume de resíduos sólidos e líquidos, produzidos diariamente. Os sólidos, constituídos pelas cascas, sementes e polpas são, na grande maioria dos casos, transformados em "pellets", os quais podem ser utilizados como componente de ração animal. Dentre os despejos líquidos, a "água amarela", formada por proteínas, óleos essenciais, pectinas, açúcares, ácidos orgânicos e sais, é aquela que mais preocupa, pelos seus altos índices de matéria orgânica, o que a torna um agente de alto potencial poluidor (TAVARES *et al.*, 1998).

Nos países tropicais, o processamento industrial de frutas cítricas é intenso e gera, além dos produtos principais, como sucos, óleos essenciais, aromas e polpas, grandes quantidades de resíduos que podem chegar a 50 % da

matéria-prima. Isso representa, em indústrias de médio porte, entre 40 e 80 toneladas por dia (De GREGORIO *et al.*, 2002).

Devido à elevada carga orgânica, o resíduo líquido proveniente do processamento de suco laranja pode ser utilizado como substrato para o cultivo de microrganismos, permitindo a bioconversão do substrato residual em biomassa microbiana, a qual tem servido para a extração de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, além do aproveitamento de compostos como ácidos orgânicos, vitaminas e enzimas excretadas pelo microrganismo. A produção de pectina a partir dos resíduos do processamento de suco de laranja possui um rendimento aproximado de 16% em base seca e o resíduo líquido gerado, aproximadamente 40 t de “água amarela”, é esterilizado e utilizado como meio de cultivo para fermentação submersa (REZZADORI & BENEDETTI, 2009).

Com exceção da laranja, a uva é a cultura frutífera mais abundante do planeta. Cultivada principalmente como *Vitis vinifera*, estima-se que anualmente sejam produzidas em todo o mundo, cerca de 61 milhões de toneladas, das quais 80% são destinadas à produção de vinho. Aproximadamente 20% desse total são representados pelo peso do bagaço (casca e semente) resultante do processamento dessas uvas, de modo que, são produzidas todo ano, mais de 9 milhões de toneladas de resíduos vinícolas, o que torna este setor uma potencial fonte geradora de resíduos (MELO *et al.*, 2010; RUBERTO *et al.*, 2007; SCHIEBER *et al.*, 2001). O bagaço constituído pelas partes sólidas das uvas (casca e semente) e por uma pequena parte do mosto é resultante da prensagem das massas vnicas obtidas de uva frescas, fermentadas ou não. Apesar de uma fração desse bagaço ser levada à destilação para a produção de uma bebida alcoólica denominada grappa, o montante residual descartado ainda é muito grande (RUBERTO *et al.*, 2007; SILVA, 2003).

Um outro resíduo com potencial aplicação biotecnológica é a casca de maracujá, que embora não seja mais considerada como um resíduo e sim como

subproduto, grande parte ainda são descartadas, incluindo cascas e sementes provenientes do processo de corte e extração da fruta para obtenção do suco, gerando inúmeras toneladas desse subproduto, o qual representa interesse econômico, científico e tecnológico (COSTA, 2007).

A produção de maracujá no Brasil se encontra à frente de outros países como Peru, Venezuela, África do Sul, Sri Lanka e Austrália. A produção brasileira de maracujá esteve, no ano de 2007, em torno de 664.286 t com rendimento de 14 t/ha<sup>-1</sup>. Neste período, a região Nordeste respondeu por 63% da produção nacional (IBGE, 2009). Um aspecto importante sobre esse tipo de material é que a casca do maracujá constitui cerca de 53% do peso total do fruto, sendo geralmente desperdiçada (SOUZA *et al.*, 2010).

Com relação aos resíduos do beneficiamento do café, dois tipos são conhecidos, sendo aqueles resultantes do processamento via úmida e do processamento via seca (OLIVEIRA *et al.*, 2001). No processo de beneficiamento a seco dos grãos de café, cerca de 50% em massa destes são considerados resíduos (BRAHAN & BRESSANI, 1978). A polpa do café e a casca contêm cafeína, taninos e matéria orgânica, tornando-se um poluente quando descartado no meio ambiente. Uma vez que é rico em matéria orgânica, pode ser utilizado como substrato para processos microbianos com intuito de obter produtos de maior valor agregado, entretanto, o uso de tais resíduos têm-se limitado a aplicações como fertilizantes, alimentação animal, compostagem entre outras utilizações mais simples (PANDEY, 2000).

O aproveitamento integral do caju também é uma meta a ser alcançada pela indústria do beneficiamento da castanha, que considera o pedúnculo dessa fruta um resíduo. Uma alternativa mais nobre para o aproveitamento desse resíduo é a sua utilização como fonte de carbono na produção de enzimas através da fermentação semi-sólida (ALCÂNTARA *et al.*, 2007). De acordo com Campos (2003) o aproveitamento industrial do caju visa, em menor escala,

o beneficiamento do pedúnculo sob a forma de sucos, doces, geléias, néctares, entre outros, porém, apenas 15 % da produção do mesmo é utilizada. Uma das causas para esse baixo aproveitamento está relacionada ao tempo de deterioração do mesmo, que ocasiona excessivas perdas no campo e na indústria.

Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma grande variedade de substratos, entre eles, efluentes de indústrias processadoras de alimentos, resíduos agrícolas e agroindustriais e resíduos derivados de petróleo. Ao se desenvolverem nesses meios os microrganismos consomem a matéria orgânica dos mesmos, promovendo a redução de sua capacidade poluidora. Este fato é constatado pela acentuada redução da DQO (Demanda Química de Oxigênio) e da DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) (TAVARES et al., 1998).

Os resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais representam uma fonte abundante e renovável de substratos que podem ser convertidos em biomassa microbiana de elevado valor nutricional. Uma tecnologia de fermentação desenvolvida a partir destes materiais resultaria em múltiplos produtos e utilizações e, através de tratamento adequado estes resíduos podem ser convertidos em substratos de cultivo para fungos (CARVALHO, 1992).

Martin et al., (2004) alcançaram atividades consideráveis de PG e PL através de fermentação em estado sólido pelos fungos *Moniella* e *Penicillium* utilizando substratos compostos por mistura de bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo. Os processos de fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando resíduos agro-industriais são economicamente interessantes, tanto pela conversão destes resíduos em produtos de alto valor agregado, quanto pela obtenção de pectinases, as quais apresentam uma série de propriedades importantes do ponto de vista industrial (SILVA, 2006).

## 2.7 Produção de enzimas pectinólíticas por microrganismos

Os microrganismos são dotados de um imenso potencial de degradação de material orgânico, produzindo um “pool” de enzimas o qual tem sido explorado comercialmente ao longo dos anos (JAYANI *et al.*, 2005). Eles transportam nutrientes através da membrana plasmática, como compostos de baixa massa molecular. Para tal, eles secretam exoenzimas, as quais hidrolisam as macromoléculas até atingir a forma e a solubilidade necessária para que sejam transportadas pela membrana. Entre estas enzimas encontram-se as amilases, pectinases, xilanases, celulasas e proteases, importantes para diversos processos com promissoras aplicações industriais (PUTZKE & PUTZKE, 2002)

Tais enzimas possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como o menor custo de produção, a possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer um amplo espectro de características físico-químicas. Apesar disso, enzimas com o mesmo perfil de atuação sobre o substrato podem apresentar funcionamento ótimo em pH, temperatura e concentração iônica diferentes, o que requer a triagem de enzimas adequadas às condições nas quais serão utilizadas. Portanto, a identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao organismo humano, é de grande interesse estratégico, pois além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Dentre os organismos estudados com o objetivo de selecionar enzimas hidrolíticas com potencial para aplicações em processos biotecnológicos, merece grande destaque os fungos filamentosos, principalmente as espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Dentre as características vantajosas destes microrganismos destacam-se a produção de um amplo espectro de

enzimas hidrolíticas com possibilidade de aplicação na hidrólise dos mais diversos substratos, sejam eles naturais ou sintéticos; produção de enzimas extracelulares, o que facilita o processo de obtenção e purificação enzimática; baixa seletividade com relação à fonte de carbono, permitindo a utilização de substratos mais baratos para o crescimento desses microrganismos em meio de cultura e facilidade de manipulação genética, possibilitando a clonagem e a engenharia de genes que codificam proteínas/enzimas de interesse (FALKOSKI, 2007).

Para Timmis & Demain (1998), as principais vantagens de se utilizar células microbianas como fontes de enzimas são: obtenção de elevadas concentrações de enzimas através de manipulação genética e ajuste das condições de cultivo, fácil e rápida triagem de microrganismos superprodutores, ciclos de fermentação curtos, uso de meios de fermentação de baixo custo, e diversidade de enzimas que catalisam a mesma reação, possibilitando flexibilidade nas condições de uso. Segundo Wolski (2008), do ponto de vista industrial, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação.

Existe um grande número de microrganismos não patogênicos capazes de produzir enzimas úteis. Fungos filamentosos são particularmente interessantes devido ao seu fácil cultivo e alta produção de enzimas extracelulares de grande potencial industrial (GUIMARÃES *et al.*, 2006). Espécies do gênero *Aspergillus* são de grande importância econômica graças a suas propriedades bioquímicas de produzir enzimas que são utilizadas nas indústrias de panificação e cervejaria, em antibióticos e ácidos orgânicos, e, há séculos, vêm sendo empregadas na produção de alimentos fermentados no Japão e em outros países asiáticos. Algumas espécies, porém, podem produzir

metabólitos secundários tóxicos, denominados “micotoxinas”, que são altamente nocivos para a saúde humana e animal (CHALFOUN & BATISTA, 2003).

Segundo De Vries (2003), espécies tais como *Aspergillus niger*, *A. carbonarius*, *A. japonicus* e *A. aculeatus*. são particularmente aplicáveis para a produção de enzimas por várias razões: são capazes de secretar elevados níveis de proteínas, possuem boas propriedades fermentativas, permitindo produção de enzimas em larga escala e produzem uma ampla gama de enzimas, tanto com atividade endo- quanto exo-, que degradam polissacarídeos de parede celular vegetal, e sobretudo, são classificados como seguros, permitindo que sejam utilizados em alimentos.

Os microorganismos utilizados para a síntese de enzimas “food-grade” são organismos bem conhecidos pertencentes à categoria GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e não estão presentes na preparação final, que, depois de purificado, contém exclusivamente a enzima (MALAJOVICH, 2004). Cepas do fungo filamentosso *Aspergillus niger* são as mais utilizadas na produção comercial de pectinases porque suas características toxicológicas são aprovadas em termos legislativos. As formas mutantes desta espécie também são bastante utilizadas, pois o rendimento de um processo enzimático pode ser melhorado através da seleção de mutantes que sejam mais resistentes à repressão catabólica e que sintetizem maiores quantidades de enzima sem a presença de um indutor (MENEZES *et al.*, 2006).

A maior parte dos microrganismos pectinolíticos produz um complexo de enzimas pectinolíticas. *Aspergillus* e *Rhizopus* são freqüentemente usados pela alta atividade pectinolítica exibida nos extratos produzidos (SANTOS *et al.*, 2008). A habilidade para sintetizar enzimas pectinolíticas é muito comum entre vários grupos de microrganismos, mas os fungos são os preferidos em escala industrial, pois cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio de cultura (UENOJO & PASTORE, 2007). O *Aspergillus niger* excreta

uma grande quantidade de pectinases tais como pectinaesterase (PE), pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG), além de outros metabólitos que dificultam a etapa de separação (FOGARTY, 1983; HARSA *et al.*, 1993).

Meneses (2007) considera o *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries como um bom produtor enzimático, pois cresce facilmente em diferentes substratos, possui características de um microrganismo GRAS, não necessita de suplementação de nutrientes ao meio de cultivo, pois se desenvolve bem em diversos resíduos agroindustriais, além de produzir enzimas durante o seu metabolismo, as quais possuem inúmeras aplicações industriais, fazendo com que esse agente apresente destaque na produção enzimática, bem como na sua posterior aplicação no setor comercial, quando comparado com outros microorganismos produtores de pectinases.

A composição dos complexos pectinolíticos de origem microbiana varia de acordo com a espécie do microrganismo produtor e, dessa forma, a seleção de isolados capazes de sintetizar enzimas com propriedades adequadas a cada processo é fundamental para a utilização industrial das mesmas (MARTINS, 2006)

### **2.7.1 Características gerais do meio de fermentação**

As enzimas obtidas de microrganismos por processos fermentativos têm sido amplamente pesquisadas e utilizadas em todo mundo (SANTOS *et al.*, 2008). Neste contexto, a escolha do meio de cultura é de particular importância para o processo enzimático. De um modo geral, o meio contém fontes de carbono, nitrogênio, fatores de crescimento, micronutrientes e também indutores enzimáticos (SANT ANNA Jr., 2001). A produção de enzimas microbianas requer uma consideração especial quanto à elaboração dos meios de cultivo, visto que esses podem conter substâncias que influenciam os fenômenos de

indução, repressão catabólica e inibição de produção e, em caso de enzimas extracelulares, os mecanismos de liberação de proteínas (GALIOTOU-PANAYOTOU *et al.*, 1997).

De acordo com Correia (2004) os meios de fermentação devem conter todos os elementos imprescindíveis à síntese do material celular e formação de produto. Quando se deseja a produção de biomassa, a composição do meio deve permitir velocidades elevadas de crescimento. Por outro lado, quando se deseja a produção de um metabólito celular, tais como as enzimas, a situação é mais complexa, visto que a composição do meio se associa sempre ao comportamento de produção dessa substância. Se a formação de produto estiver associada ao crescimento, o meio deve satisfazer tanto as necessidades para a multiplicação celular quanto para a geração do metabólito.

Condições de processo como as concentrações de oxigênio dissolvido, substrato, nitrogênio, fosfato, micronutrientes, pH e o teor de inóculo, afetam de forma distinta a morfologia de diferentes linhagens de fungos. Consequentemente, tais condições devem ser avaliadas a fim de que favoreçam o desenvolvimento e a produção pelo microrganismo (FONTANA, 2009).

O tamanho das partículas do substrato também influencia o crescimento do microrganismo. Partículas de tamanho reduzido oferecem maior área superficial ao ataque microbiano, mas, ao mesmo tempo, tendem a se compactar facilmente, comprometendo a respiração e aeração do sistema. Já as partículas maiores promovem mais espaço interpartículas diminuindo, porém, o rendimento da absorção dos nutrientes pelo microrganismo (SOUZA *et al.*, 2007). De acordo com Pinto *et al.*, (2006), o substrato não deve apresentar aglomeração das suas partículas individuais para que o ar necessário ao desenvolvimento microbiano atravesse os espaços vazios do meio. Para Mitchell *et al.*, (2000), o tamanho ótimo da partícula deve favorecer o acesso aos nutrientes e disponibilização de oxigênio. Partículas com tamanho menores que

1 mm a 1cm tem sido frequentemente usadas em fermentação em estado sólido (FES).

Meios de cultivo com concentrações balanceadas de açúcares e pectina levam a melhores resultados na produção de enzimas pécnicas em processo submerso. A presença de pectina no meio de cultura tem efeito indutor e favorece a excreção da enzima, nesse caso as pectinases. No entanto, por razões econômicas, a pectina normalmente é substituída por resíduos agroindustriais com alto teor de pectina (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

Altas concentrações de açúcares no meio suprem a necessidade dos microrganismos para seu crescimento, sendo a pectina do meio pouco utilizada. Porém, em condições restritivas de concentração de açúcares o metabolismo é direcionado para a quebra da molécula de pectina, de modo que esta possa ser consumida, levando a altas atividades pectinolíticas (FAWOLE & ODUNFA, 2003). Em trabalhos realizados por Souza et al.,(2010) sobre a caracterização de poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando resíduo de maracujá como substrato, não foi necessária a adição de pectina e açúcar ao meio, demonstrando que este resíduo apresenta características favoráveis para a produção de enzimas pectinolíticas. Cordeiro & Martins (2009) observaram que subsequentes aumentos na concentração de pectina cítrica não resultaram em acréscimo considerável na atividade da enzima, apesar do aumento observado no crescimento do microrganismo.

Os substratos sólidos contendo açúcares solúveis tais como polpa de uva, sorgo doce, beterraba doce, restos de abacaxi, polpa de café, casca de manga e banana, por possuírem altos teores de açúcares redutores prontamente assimiláveis pelo microrganismo, promovem a repressão catabólica de enzimas despolimerizantes, além de suas partículas altamente higroscópicas se compactarem facilmente reduzindo a troca de calor e gases (SILVA *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2002).

Rizzatto (1999) estudando a produção e produtividade de pectinase por *Penicillium italicum* e por *Aspergillus niger* através de fermentação semi-sólida de bagaço de laranja industrialmente processado, verificou que a adição de sacarose ao bagaço promoveu atividade máxima para *P. italicum* quando comparado aos meios adicionados de glicose e frutose. Já o fungo *A. niger* produziu pouca atividade de pectinase nos meios aos quais foram adicionados os açúcares.

Lima (2002) avaliou a produção de pectinases em fermentação submersa utilizando os microrganismos *Aspergillus niger*, *Humicola grisea*, *Penicillium italicum* e *Pichia canadensis* em diferentes meios de cultura contendo pectina, pectina e sacarose, pectina e glicose. *A. niger* produziu maiores atividades de exo-PG (0,73 U/mL) em meio contendo sacarose e de endo-PG (56,83 U/mL) em meio contendo glicose, já a pectina liase foi produzida com maior atividade em meio contendo glicose (0,210 U/mL) utilizando-se *P. canadensis* e pectinaesterase em meio contendo apenas pectina como fonte de carbono (0,076 U/mL) utilizando-se *H. grisea*.

Os resíduos agroindustriais têm sido os substratos mais pesquisados para processos fermentativos, pois são baratos e abundantes, além de apresentarem estrutura polimérica e composição rica em amido, lignocelulose e pectina. Esses materiais orgânicos são fontes de carbono e nitrogênio, atuando como suporte para o crescimento de microrganismos (CORREIA, 2004). Aqueles materiais que fornecem todos os nutrientes necessários ao crescimento celular são considerados substratos ideais. Entretanto, em muitos casos, alguns nutrientes encontram-se em concentrações abaixo da mínima, sendo necessária suplementação do meio. Nesse caso, pode-se incorporar soluções de nutrientes ao substrato, visando adequá-lo melhor às condições nutricionais do microrganismo para a fermentação desejada, como no caso do enriquecimento

protéico, quando são utilizadas fontes de nitrogênio tais como amônia, uréia ou sulfato de amônia (ROCHA, 2010).

De acordo com Raimbault (1998), muitas vezes esses substratos necessitam ainda de preparação e pré-tratamento, a fim de converter estes materiais em substâncias mais prontamente utilizáveis pelos microrganismos. O tratamento do substrato pode ser feito através de métodos físicos, como a redução de tamanho e a secagem ou químicos, como a hidrólise ácida ou enzimática.

### **2.7.2 Fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS)**

Fermentação, sob o ponto de vista biotecnológico, pode ser definida como a transformação de um substrato em um determinado produto pela ação de microrganismos, podendo ser desenvolvida por processo submerso ou sólido (MITCHELL *et al.*, 2000; SILVA, 2003). Os processos fermentativos constituem um dos métodos mais antigos e extremamente utilizados para a produção de enzimas pelo qual os microrganismos, geralmente bactérias, fungos e leveduras, retiram do meio em que estão acondicionados, o material necessário para a sua subsistência, ao mesmo tempo em que as enzimas catalisam substâncias que serão empregadas em processos industriais. Dentre os processos fermentativos utilizados, têm-se a fermentação submersa, onde o meio no qual se desenvolve o microrganismo é líquido e a fermentação em estado sólido onde o meio utilizado, é sólido (FEITOSA, 2009).

Dentre os processos fermentativos utilizados para a produção de enzimas, a fermentação submersa (FS) tem sido a mais usada. Entretanto, nas últimas décadas têm aumentado a tendência do uso da fermentação em estado sólido (FES) para a produção de algumas enzimas, em especial aquelas envolvidas na degradação de polímeros vegetais complexos (RODRIGUEZ

COUTO & SANROMÁN, 2005). Para Martin (2006) tanto o processo de FES quanto o de FS apresentam características importantes, as quais devem ser levadas em conta no momento da escolha, sendo necessário avaliar as vantagens e desvantagens em cada processo fermentativo, considerando o tipo de produto desejado e, principalmente, o grupo de microrganismos a ser utilizado.

Na fermentação em meio semi-sólido, o teor de umidade pode influenciar o estado físico do substrato, a disponibilidade e difusão de nutrientes e a troca de oxigênio e de CO<sub>2</sub> no meio. O elevado teor de umidade inicial pode afetar o crescimento do microrganismo, pois a porosidade do meio e a difusão de oxigênio são reduzidas, dificultando a formação do produto. Por outro lado, em baixos teores de umidade inicial, a produção enzimática também pode ser reduzida porque o fungo sofre modificações na membrana celular, conduzindo a limitações de transporte e afetando o metabolismo microbiano (MENEZES *et al.*, 2006).

Segundo Rocha (2010), generalizar vantagens relacionadas aos processos submersos, ou em estado sólido não é tarefa fácil uma vez que cada microrganismo pode melhor se adequar a um ou outro processo, bem como produzir complexos enzimáticos diferentes. A fermentação em estado sólido (FES) geralmente é preferida por permitir a produção de enzimas brutas mais concentradas e, conseqüentemente, com menores custos de extração e purificação, além disso, o processo de FES estimula as condições de crescimento de vários fungos filamentosos já que o meio se aproxima do habitat natural desses microrganismos (SILVA *et al.*, 2002; HOLKER & LENZ, 2005).

A fermentação em estado sólido (FES) baseia-se em crescimento e metabolismo dos microrganismos em sólidos úmidos sem a presença de água livre. Esse processo tem ganhado importância e atenção de pesquisadores devido aos baixos custos dos meios de cultivos, a alta produtividade e seu reconhecimento como tecnologias limpas. Entretanto a sua implementação na

prática ainda é muito pequena quando comparada com as fermentações submersas. Entre os principais problemas que apresentam as fermentações sólidas estão a manipulação dos sólidos, a instrumentação e o controle do processo (FERNÁNDEZ, 2009).

Para Fontana (2009), no caso de maiores escalas de produção, os processos em estados sólido (FES) apresentam seríssimas limitações com respeito ao controle de parâmetros operacionais críticos como o suprimento de oxigênio, pH e o controle de temperatura. Já com relação à fermentação submersa (FS), existe uma maior facilidade de acompanhamento das condições ambientais devido à homogeneidade da suspensão de células microbianas e da solução de nutrientes e produtos na fase líquida.

Considerando ainda algumas limitações da fermentação em estado sólido pode-se destacar ainda a dificuldade de remoção do calor gerado pelo metabolismo microbiano, além disso, a heterogeneidade da mistura na FES dificulta o crescimento celular e o controle de parâmetros tais como temperatura, pH, agitação, aeração e concentração de nutrientes e produtos, o que torna complicado controlar e automatizar o processo (PALMA, 2003). Para Rocha (2010) uma das grandes dificuldades ainda encontrada para o processo de FES é a mudança de escala, ou seja, reproduzir resultados obtidos em laboratório em processos de maiores dimensões a fim de gerar quantidades satisfatórias de produtos em escala industrial.

A fermentação em estado sólido, entretanto, apresenta algumas vantagens com relação à fermentação submersa, principalmente quando os agentes de transformação são fungos filamentosos. Isso, porque as condições de cultivo são mais parecidas com o *habitat* natural dos fungos filamentosos, sendo assim, estes estão mais adaptados para crescer e excretar maiores quantidades de enzimas (PANDEY, 2003).

A concentração de inóculo é também importante quando se trata de fermentações em substratos sólidos, uma vez que a baixa concentração de inóculo pode favorecer o desenvolvimento de contaminantes e formar pouca biomassa. Já um inóculo com elevada concentração de esporos pode exaurir o meio para formação de biomassa, reduzindo a quantidade do produto que se deseja obter. Quando se deseja a produção de biomassa, recomenda-se o emprego de inóculo elevado para evitar contaminantes, porém deve-se ter cuidado para não elevar muito o custo de produção com o preparo do inóculo (ARAÚJO, 2004).

As fermentações submersas (FS) incluem uma variedade grande de processos microbianos na qual a biomassa é completamente rodeada pelo meio de cultivo líquido, com nutrientes solúveis. O substrato encontra-se dissolvido na fase líquida, estando o meio qualitativa e quantitativamente mais equilibrado e homogêneo quando comparado com a fermentação em estado sólido, permitindo uma regulação mais uniforme do metabolismo microbiano, um melhor controle das trocas gasosas e maior facilidade de remoção dos metabólitos quando excretados no meio (ROCHA, 2010; PAGNOCELLI, 2002; CASTILHO *et al.*, 2000).

Mitchell et al., (2000) define fermentação submersa (FS) como aquela cujo substrato fica dissolvido ou suspenso em pequenas partículas no líquido, normalmente água. Na FS a água chega a constituir cerca de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado. Esse tipo de fermentação apresenta como principais vantagens, o fácil acompanhamento da formação do produto e consumo do substrato e o controle dos parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação e esterilidade. Como principais desvantagens, têm-se o grande volume de resíduos gerados e a dificuldade de separação produto / substrato. Segundo Correia (2004) mais de 90% das enzimas comerciais são produzidas por sistemas de fermentação líquida em tanques profundos.

Para Fernández (2009) uma das maiores vantagens dos processos de fermentação submersa em grande escala é a facilidade de manuseio das vazões líquidas de alimentação e saída do fermentador, permitindo diferentes manipulações dos processos fermentativos, tais como os processos em batelada, contínuos ou retro alimentados. As facilidades de manipulação das vazões líquidas permitem ainda um maior nível de produção que normalmente está relacionado com os custos de produção.

Os meios de cultivo em fermentação submersa (FSM) são formulados através da utilização de compostos quimicamente conhecidos que são conhecidos como meios sintéticos ou semi-sintéticos ou através do uso de matérias primas naturais, entretanto, em escala industrial a utilização de meios sintéticos torna-se muito cara e a opção geralmente é feita por matérias-primas provenientes da agroindústria (SANT'ANNA Jr., 2001).

Tanto o processo de fermentação submersa quanto em estado sólido apresentam características importantes (Tabela 1), as quais devem ser levadas em consideração para a obtenção de enzimas microbianas, o que torna necessário avaliar, sob aspecto comparativo a produção das enzimas em ambos os processos, levando-se em conta principalmente a eficiência na produção, as isoformas produzidas, além das propriedades bioquímicas das enzimas obtidas em cada um (SILVA, 2006).

Tabela 1 Comparação entre fermentação submersa e fermentação em estado sólido

| <b>Fator</b>                                 | <b>Cultivo Submerso</b>  | <b>Fermentação em Estado Sólido</b>                            |
|--|--|--|
| Substrato                                    | Substâncias solúveis   | Polímeros insolúveis   |
| Condições de Assepsia                        | Esterilização com calor; controle asséptico                          | Uso de vapor; condições não estéreis                           |
| Aeração                                      | Limitação de oxigênio; altos níveis de O <sub>2</sub> são requeridos | Fácil aeração e alta superfície de troca entre ar e substrato  |
| Água   | Grandes volumes de água e de efluentes                               | Consumo limitado de água, baixa a <sub>w</sub> ; sem efluentes |
| Aquecimento metabólico                       | Fácil controle de temperatura  | Baixa capacidade de transferência de calor                     |
| Agitação mecânica                            | Boa homogeneização   | Condições estáticas  |
| Controle de pH                               | Fácil controle de pH   | Substratos sólidos tamponados                                  |
| Processo                                     | Contínuo   | Batelada   |
| Contaminação                                 | Riscos para linhagens específicas                                    | Riscos para fungos com crescimento lento                       |
| Consumo energético                           | Alto consumo de energia  | Baixo consumo de energia                                       |
| Concentração do produto (g.L <sup>-1</sup> ) | 30 - 80  | 100 - 300  |

Fonte: Adaptado de Raimbault (1998)

## REFERÊNCIAS

ALAHNA, A.; ALKORTA, I.; DOMÍNGUEZ, J. B. *et al.* Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. **App. Environm. Microbiol.** 1990.

ALCANTARA, S. R.; ALMEIDA, F. de A. C. de; SILVA, F. L. H. da. Emprego do bagaço do pedúnculo do caju para posterior utilização em um processo de fermentação semi-sólida. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.9, n.2, p.137-142, 2007.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J. *et al.* Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Proc. Biochem** 33: 21-28, 1998.

ALVES, S. B.; FERRAZ, L. C. C. B.; BRANCO, Jr. A. C. Chave para Identificação de Patógenos de insetos. In: S. B. ALVES. **Controle Microbiano de Insetos**. Piracicaba-SP. FEALQ, p.1039-1074, 1998.

ALVES, E.; CASTRO, H. A. de. Fungos associados ao café (*Coffea arábica* L.) nas fases de pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopathologica**, v. 24, n. 1, p. 4-7, 1998.

ALVES, E. **População fúngica associada ao café (*Coffea arábica* L.) beneficiado e às fases pré e pós-colheita – Relação com a bebida e local de cultivo**. Lavras: UFLA, 1996. 49p. (Dissertação - Mestrado em Fitossanidade).

ANCHORENA-MATIENZO, P. **Re-identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares** (Dissertação) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba – SP, setembro, 2002.

ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; LADEIRA, S. A. *et al.* Produção de poligalacturonase usando *Bacillus* sp. por fermentação submersa. **Perspectivas on line**, v. 5, nº 17, p. 135-141, 2011.

ARAÚJO, L. F. **Enriquecimento Protéico do Mandacaru sem Espinhos e Palma Forrageira por Fermentação Semi-Sólida**. 2004. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB.

ARAÚJO, E. S. de.; SANTOS, A. M. dos.; AREIAS, R. G. D. M. *et al.* Uso de RAPD para a análise de diversidade genética em arroz. **Agroномia**, v.37, nº .1, p.33 - 37, 2003.

- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *et al.* Biotecnologia industrial: Biotecnologia na produção de alimentos, vol. 4, São Paulo: Edgard Blucher, 2001, 523p.
- BAILEY, M. J.; PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme Microbial Technology**, Woburn, v. 12, nº4, p. 266-271, Apr. 1990.
- BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of biotechnology**, Amsterdam, v. 66, nº 2-3, p. 101-107, Dec. 1998.
- BOCCAS, F.; ROUSSOS, S.; GUTIERREZ-ROJAS, M. *et al.* Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. **Journal of Food and Science Technology**, v. 31, p. 22-26, 1994.
- BON, E. P. S. **Enzimas industriais: política e gestão**. In: Seminário Brasileiro de Biotecnologia Enzimática, 5., 2002, Brasília. Anais..... Brasília, DF, 2002.
- BRAHAM, J.E.; BRESSANI, R. Composición de la pulpa de café y otros subproductos. In: ELIAS, L.G. **Pulpa de café**: composición, tecnología y utilización. Panamá: INCAP, 1978.p. 19-29.
- BRAMMER, S. P. Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal. **Documentos on line** (Embrapa) nº 3, 1518-6512, dez., 2000.
- BRAVERMAN, J. B. S. **Introduction to the biochemistry of foods**. Amsterdam: Elsevier, 1963.
- BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P. de; SCHWAN, R. F. *et al.* Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciênc. agrotec.**, v.24 (Edição Especial), p.137-152, dez., 2000.
- BUENO, M. C.; OLIVEIRA, E. M. de; GATTÁS, E. A. de L. Efeito das condições de cultivo sobre a produção de poligalacturonase e pectinaesterase de *Aspergillus* sp. **Alim. Nutr.**, v. 13, p. 93-102, São Paulo, 2002.
- BURGESS, T.; MALAJCZUK, N.; DELL, B. Variation in *Pisolithus* and basidiospore morphology, culture characteristics and analysis of polypeptides using 1D SDS-PAGE. **Mycological Research** 99:1-13. 1995.

CAMARGO, L. A.; DENTILLO, D. B.; CARDELLO, L. *et al.* Utilização de bagaço de laranja na produção de pectinase de *Aspergillus* sp. **Alim. Nutr.**, Araraquara v. 16, nº 2, p. 153-156, abr./jun. 2005.

CAMPOS, A. R. N.; **Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale L.*) por fermentação semi-sólida.** (Dissertação de mestrado), Campina Grande: UFCG, 2003. 85p.

CARVALHO, S. **Pectinases produzidas pelo agente biológico “G088”: extração e purificação.** 2007. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) \_ Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CARVALHO, P. de O.; CALAFATTI, S. A. P. MARASSI, M. *et al.* Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases. **Química Nova**, vol. 28, nº4, 614-621, 2005.

CARVALHO, F. C. Disponibilidade de resíduos agroindustriais e do beneficiamento de produtos agrícolas. In: **Simpósio sobre utilização de subprodutos agroindústrias e resíduos de colheita na alimentação de ruminantes**, 1992, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Embrapa – UEPAE, 1992, p.7-27.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C.M. S.; BARUQUE, E. A. *et al.* Economic analyses of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4. p. 239-247, 2000.

CASTRO, R. J. S. de; TORRES, M. B. O.; FREITAS, A. C. *et al.* **Estudo da Produção de Poligalacturonase por Fermentação em Estado Sólido utilizando Torta de Girassol como Substrato.** XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 7p., 2009, Natal – RN.

CHALFOUN, S. M.; BATISTA, L. R. Fungos associados a frutos e grãos do café: *Aspergillus* e *Penicillium*. Embrapa Informação Tecnológica, 2003, 69p. Brasília – DF.

CORDEIRO, C. A. M; MARTINS, M. L. L. Production of a polygalacturonase, by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzyme. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol.29, nº1, Campinas Jan./Mar. 2009.

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido em resíduos de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus***. Tese-Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2004.

COSTA, L. M. A. S. **Utilização de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de enzimas pectinolíticas pelo agente biológico “GO88”**. 2007. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) \_ Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

DE GREGORIO, A.; MANDALARI, G.; ARENA, N. *et al.* SCP and crude pectinase production by slurry-state fermentation of lemon pulps. **Bioresource Technology**, v.83, n.2, p.89-94, 2002.

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

DUARTE, J. M. **Estudo da divergência genética em raças de Feijão por meio de marcadores RAPD**. 1998. 78p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

EVANGELISTA, J. Tecnologia de Alimentos, São Paulo, ed. Atheneu, 2005, 652p.

FALKOSKI, D. L. **Purificação e caracterização de  $\alpha$ -galactosidasas do fungo *Penicillium griseoroseum* para utilização na hidrólise de oligossacarídeos de rafinose em derivados de soja**. (Dissertação – Mestrado). 96p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2007.

FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodegradation & Biodegradation**, v.52, p.223-227, 2003.

FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa.** Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos), 2009, 104p. Universidade Tiradentes, Aracaju – SE.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes.** 2009. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) \_ Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FERNÁNDEZ, D. E. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial.** 125p (Tese Pós-graduação em Processos Biotecnológicos), Curitiba, 2009.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

FINCHAM, J. R. S. Transformation in fungi. **Microbiol. Rev.** 53:148-170, 1989.

FONTANA, R. C. **Estudo da produção de poligalacturonases em processo submerso em biorreatores de agitação mecânica e airlift.** Tese (Doutorado) \_ Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-graduação em biotecnologia, 2009.

FOGARTY, W. M.; KELLY, C.T. **Pectic enzymes Em: Microbial Enzyme and Biotechnology** (Fogarty, W.M., Ed.), pág. 131–182. Applied Science Publishers, London, UK. 1983.

FUNGARO, M. H. P. **PCR na Micologia: Diagnóstico e Análise de Variabilidade.** Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, 2004.

FUNGARO, M. H., VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I. S., AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia Microbiana.** Jaguariúna: Embrapa – CNPMA. 1998. p. 205-227.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos.** 1. ed. São Paulo: Nobel, 1998,104p.

GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KAPANTAI, M.; KALANTZI, O. Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM -3482 for polygalacturonase production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 47: 425-429, 1997.

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M. *et al.* Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal Microbiol.**, vol.37, nº4, São Paulo, Out./Dez., 2006.

GUMMANDI, S. N & PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases: a review. **Proc. Biochem** 38: 987-996, 2003.

HARSA, S.; ZAROR, C. A.; PYLE, D. L. Production of polygalacturonases from *Kluyveromyces marxianus* fermentation: preliminary process design and economics. **Process Biochemistry**, v. 28, p. 187-195. 1993.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, nº 2, p. 235-251, Feb. 2006.

HERMANN, S.; HERNANDEZ, F.; RIVALDI, J. D. *et al.* **Produção de Pectina Liase e Amilase por Fermentação no Estado Sólido à Base de Bagaço de Laranja e Farelo de Arroz.** Embrapa Meio Ambiente, 2008, 6p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento sistemático da produção agrícola. <<http://www.ibge.gov.br/>>. 5 Mar. 2009.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S. *et al.* Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Biores Technol.** 94: 29-24, 2001.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, 2005.

LEAL, S. C. M. **Detection and Characterisation of *Metarhizium anisopliae* Using Molecular Markers.** PhD, University of Nottingham, 215p., 1996.

LIMA, A. A.; QUEIROZ, P. R.; SANTOS, C. F. *et al.* **Identificação molecular de linhagens de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* utilizando marcadores RAPD.** Brasília – DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

LIMA, A. S. **Extração líquido-líquido de pectinase microbiana**. Tese (Doutorado). 2002. Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA), Unicamp, SP.

MALAJOVICH, M. A. Biotecnologia, Rio de Janeiro: Axcel Books do Brasil ed., 2004, 344p.

MALDONADO, M. C.; STRASSER de SAAD, A. M. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state system. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, 20: 34-38, 1998.

MALLER, A. **Produção, Purificação e Caracterização do Complexo Pectinolítico do Fungo *Aspergillus niveus*** (Dissertação). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2008. 98p.

MARTINS, E. da S. **Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido**. 2006. 108f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) \_ Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

MARTIN, N. **Isolamento de linhagens fúngicas termofílicas produtoras de pectinases: Produção, Caracterização e Purificação parcial da poligalacturonase** (Dissertação) \_ Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 65p. Rio Claro, 2006.

MARTINS, E. da S.; SILVA, D.; SILVA, R. da. *et al.* **Perfil Enzimático produzido pelo Fungo Termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de Fermentação em Estado Sólido e Fracionamento de uma Poligalacturonase Termoestável**. Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto – SP, 2005.

MARTIN, N.; SOUZA, S. R. de; SILVA, R. da. *et al.* Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 47, n°5, Curitiba, set./2004.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R. *et al.* Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Proc. Biochem.** 37, 49-954. 2002.

MELO, P. S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais** (Dissertação ). 100p. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba – SP, 2010.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I. *et al.* Genetic variability in rDNA ITS region of *Trichoderma* spp. (biocontrole agent) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi* isolates. **Ciênc. agrotec.** v. 34, n°1, Lavras, Jan./Fev., 2010.

MENESES, A. G. **Produção de enzimas pectinolíticas e seletividade de produtos fitossanitários sobre o agente biológico “G088”**. 2007. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) \_ Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MENEZES, G. D. G. de; OLIVEIRA, A. C. P. de; DAMASO, M. C. T. *et al.* Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. **Rev. Univ. Rural**, Série Ciências Exatas e da Terra. Seropédica, RJ, EDUR, v. 25, n° 1, p. 15-27, 2006.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi: progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, p. 177-185, Mar./Apr. 2008.

MINUSSI, R. C.; RAMOS, J. R. L. S.; COELHO, J. L. C. *et al.* Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. **Rev. Microbiol.** v.29, n.4, São Paulo, Oct./Dec. 1998.

MORICCA, S.; RAGAZZI, A.; KASUGA, T. *et al.* Detection Fusarium oxysporum f. sp. Vasinfectum in cotton tissue by polymerase chain reaction. **Plant. Pathol.**, v. 47, p. 486-494, 1998.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical Engineering Aspects of Solid State Bioprocessing. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 68. p 61-138, 2000.

MITIDIERI, S.; CAMASSOLA, S.; SCHRANK, A. *et al.* **Produção de protease para formulação de detergentes biodegradáveis**. In: Seminário Brasileiro de Biotecnologia Enzimática, 5., 2002, Brasília, **Resumos.....**Brasília, DF, 2002.

OLIVEIRA, A. N. de; OLIVEIRA, L. A. de; ANDRADE, J. S. *et al.* Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 2006, vol.26, nº4, p. 853-860.

OLIVEIRA, J. S.; SOUZA, S. E. de; OLIVEIRA, L. L. de. *et al.* Distribuição do fungo *Cladosporium cladosporioides* em regiões produtoras de café na Bahia. **Bahia Agrícola**, v.6, n.3, nov. 2004.

OLIVEIRA, V. D.; FIALHO, E. T.; LIMA, J. A. F. *et al.* Substituição do milho por casca de café em rações isoenergéticas para suínos em crescimento e terminação. **Ciência & Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.2, p.424-436, mar./abr. 2001.

PALMA, M. B. **Produção de xilanases por *Thermosascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. Tese (Doutorado em Engenharia Química), - Centro Tecnológico, Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PANAROTTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. **Avaliação das casca de limão Taiti como fonte de indutor na produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em estado sólido**. Universidade de Caxias do Sul \_ Instituto de Biotecnologia, Caxias do Sul – RS, 2006.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. *et al.* Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Netherlands, v.6, n.2, p153-162, jan. 2000.

PANDEY, A. Solide-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, nº2, p. 81-84, 2003.

PEREIRA, R. T. G.; PFENNING, L. H.; CASTRO, H. A de. Caracterização de dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) De Vries em frutos do cafeeiro (*Coffea Arabica* L.). **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1112-1116, nov./dez., 2005.

PEREIRA, M. S. A. **Purificação de uma endo-poligalacturonase produzida por *Kluyveromyces marxianus*, utilizando sistemas de duas fases aquosas.** (Dissertação), Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 2005.

PEREIRA, R. T. G. **Diversity and frequency of fungi associated to fruits and grains of coffee.** 2006. 151p. Thesis (Doctorate in Agronomy), Federal University of Lavras, Lavras, MG.

PEREIRA, R. T. G. **Influence of *Cladosporium cladosporioides* on the quality of coffee.** 2002. 42p. Dissertation (Master Science in Phytopathology) \_ Federal University of Lavras, Lavras, MG.

PEREIRA, R. G.; BORÉM, F. M.; VILELA, T. **Caracterização microbiológica e qualidade da bebida de cafés (*Coffea arabica* L.) da região Alto Rio Grande – Sul de Minas Gerais.** In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DO CAFÉ DO BRASIL, 2001, Vitória, ES. Resumos... Brasília, Embrapa Café, 2001.

PIMENTA, C. J. **Qualidade do café (*Coffea arabica* L.) originado de frutos colhidos em 4 estádios de maturação.** 1995. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H. da. *et al.* Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. **Revista de Química Industrial**, v.74, n.724, p.17-20, 2006.

PIRES, A. P. D. **Diversidade genética e caracterização molecular em linhagens de *Beauveria bassiana*.** (Dissertação) Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE, 2002.

PRADE, R. A.; ZHANG, D. F.; AYOUBI, P. *et al.* Pectins, pectinases and lantmicrobe interactions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.16, p.361- 391 1999.

PUNT, P. J.; BIEZEN, N. V.; CONESA, A. *et al.* Filamentous fungi as cell factories for heterologous prote in production, **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 20, nº 5, p. 200-206, May, 2002.

- 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. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.1, n.3, 1998.
- REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MARKOVIC, O. Pectic enzymes. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem**, 1976, p.323-385.
- REZZADORI, K.; BENEDETTI, S. **Proposições para Valorização de Resíduos do Processamento do Suco de Laranja**. 2º International Workshop Advances in Cleaner Production, São Paulo, Maio, 2009. 11p.
- RIZZATTO, M. L. **Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de laranja industrializado**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas \_ Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas – SP, 1999.
- ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido**. (Dissertação de Mestrado). 136p. Universidade Federal de Uberlândia \_ Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, 2010.
- RODRIGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, p. 211-219, 2005.
- ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectic enzymes. In: Microbial Enzymes and Bioconversions, v. 5, p. 227-282, ed. A. H. Rose. Academic Press, London, 1980.
- ROSA, D. D.; MACHADO, M. A.; TARGON, M L. N. *et al.* Genotypic diversity among *P. parasitica* isolates revealed by ITS-5.8S rDNA nucleotide sequences. **Summa Phytopathol.** v.32, nº2, Botucatu, Abr./Jun., 2006.
- RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C. *et al.* Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, p. 203-210, jan., 2007.
- SAKAI, T. SAKAMOTO, T., HALLAERT, J. *et al.* Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. **Advances in Applied Microbiology**, 39: p. 213-294, 1993.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C. *et al.* **Introduction to food and air-borne fungi**. 6. ed. Baarn: CBS, 2000. 389 p.

SANT ANNA JR., G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. (Coords.). *Processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001, v. 3, cap. 14. (Série Biotecnologia Industrial).

SANTOS, T. C. dos, GOMES, D. P. P., FILHO, G. A., FRANCO, M. Enriquecimento protéico dos resíduos sólidos do processamento de frutas. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, vol. 6, nº11, 2010, 7p.

SANTOS, S. F. de M.; MACEDO, G. R. de; SILVA, F. L. H. da. *et al.* Aplicação da metodologia da superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. **Quim. Nova**, vol. 31, nº8, p.1973-1978, 2008.

SANTOS, S. F. de M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. (Tese de Doutorado). Dez, 2007, Natal – RN.

SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais**. (Dissertação de Mestrado). 90p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2005.

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

SCHIEBER, A; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By products of plant food processing as a source of functional compounds \_ recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 12, p. 401-413, nov., 2001.

SEMENOVA, M.; SINITSYNA, O.; MOROZOVA, V. *et al.* Use of a preparation from fungal pectin lyase in the food industry. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p. 598-602, 2006.

SILVA, D. **Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases produzidas pelo fungo *Penicillium viridicatum* RFC3 em fermentação em estado sólido e submersa.** (Tese – Doutorado), 2006, 141p. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro – SP.

SILVA, L. M. L. R. Caracterização dos subprodutos da vinificação. **Milennium**, Visei, v. 28, p. 123-133, out., 2003.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; DA SILVA, R. *et al.* Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Braz. J. Microbiol.** 33, 318-324, 2002.

SOUZA, R. L. A. de, OLIVEIRA, L. de S. C., SILVA, F. L. H. da; *et al.* Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, vol. 14, nº 9, Campina Grande, set./2010.

SOUZA, R. L. A.; AMORIN, B. C.; SILVA, F. L. H. da; *et al.* **Caracterização do resíduo seco do maracujá para utilização em fermentação semi-sólida.** In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 16, 2007, Curitiba, Anais... Curitiba: UFPR, 2007.

SPAGNA, G., PIFFERI, P. G., TRAMONTINI, M. *et al.* Pectinlyase immobilization on polyamides for application in the food processing industry. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v.59, p.341-348, 1994.

SWENSEN, S. M. Randomly Amplified Polimorphic DNA (RAPD): Methods and analysis. Workshop booklet. San Diego, CA. 33p. 1995.

TARDY, F.; NASSER, W.; ROBERT-BAUDOUIY, J. *et al.* Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. **Journal of Bacteriology**, 179: p.2503-2511, 1997.

TAVARES, V. B.; SIVIERI, K.; CERON, C. A. *et al.* Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Quím. Nova**, 1998, vol.21, nº6, p. 722-725.

- TIMMIS, K. N.; DEMAIN, A. L. (1998). **Ecology and industrial microbiology**. Strange bedfellows. *Current Opinion in Microbiology*, v. 1, p. 267-270.
- TRIBESS, T. B. **Estudo da cinética de inativação térmica da pectinesterase em suco de laranja natural minimamente processado**. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quim. Nova**, vol. 30, n.º2, 388-394, 2007.
- URBEN, A. F.; OLIVEIRA, A. S. Caracterização morfológica em diferentes isolados de *Fusarium moniliforme* infectando sementes transgênicas de milho procedentes dos Estados Unidos. **Fitopatologia Brasileira**, 24:339. 1999 (Resumo).
- VALLE, R. H. P.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J. V. *et al.* Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. **Braz. J. Microbiol.** v.32, n.2, São Paulo, abr./jun. 2001.
- VRIES, R.P.; *et al.* Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. **FEBS Letters**, v. 530, p. 41-47, 2002.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J. *et al.* **DNA polymorphism and amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers**. *Nucleic Acid Research* 18:6531-6535. 1990.
- WOLSKI, E. **Estudo comparativo da produção de lipase por fermentação submersa utilizando *Penicillium sp.* livre e imobilizado**. (Dissertação de Mestrado). 84p. Erechim – RS, Brasil, 2008.

## **CAPÍTULO 2**

**Identificação molecular de isolados de *Cladosporium Cladosporioides* (Fres.)  
*de Vries***

## RESUMO

O uso dos fungos como produtores de enzimas de interesse biotecnológico e também como agentes de controle biológico depende de uma caracterização adequada, possibilitando a identificação e o melhoramento de linhagens selecionadas. Dentre as técnicas moleculares utilizadas para avaliar a diversidade genética entre isolados têm-se o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Alguns isolados de fungos filamentosos têm sido relatados como agentes bioprotetores do café, protegendo o grão contra ataque de insetos e outros tipos de microrganismos deletérios à qualidade do café e ainda como produtores de enzimas de interesse biotecnológico. Esses isolados foram identificados morfológicamente como pertencentes ao gênero *Cladosporium*. Fungos deste gênero são endofíticos, entomopatogênicos, facilmente isolados de folhas, frutos e grãos do cafeeiro. Por isso, baseado nos efeitos de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries como agente bioprotetor da qualidade do café e produtor de pectinases, o presente estudo teve por objetivo avaliar a diversidade genética entre isolados utilizando a técnica de RAPD. Foram utilizados 10 *primers* arbitrários para análise por RAPD de seis isolados do gênero *Cladosporium* provenientes de plantas de café de diferentes regiões do estado de Minas Gerais. A % de similaridade genética foi analisada pelo padrão de bandas obtidas pelo RAPD utilizando o programa computacional UPGMA. Os resultados demonstraram que os isolados não apresentam genoma idêntico, já que pôde ser observado polimorfismo com os *primers* utilizados. Esses isolados foram identificados molecularmente pelo seqüenciamento da região ITS do rDNA. O alinhamento das seqüências da região ITS mostrou identidade máxima de nucleotídeos de 94% com seqüências depositadas no GenBank de *Cladosporium cladosporioides*, demonstrando que o seqüenciamento dessa região foi um método eficiente na identificação dos isolados.

Palavras-chave: Identificação molecular. *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. Diversidade genética. RAPD (*Random Amplified Polimorphic*).

## ABSTRACT

The use of fungi as producers enzymes of biotechnological interest as well biological control agents depends on adequate characterization, enabling the identification and improvement of selected strains. Among the molecular techniques used to evaluate the genetic diversity among isolates has been the RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Some isolates of filamentous fungi have been reported as agents bioprotectors coffee, protecting the grain against insect attack and other types of microorganisms deleterious to the quality coffee and producers of enzymes biotechnological interest. These isolates were morphologically identified as belonging to the genus *Cladosporium*. Fungi of this genus are endophytic, entomopathogenic, easily isolated from leaves, fruits and coffee beans. Therefore, based on the effects of *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries as agent bioprotector coffee quality and producers of pectinases, this study aimed to evaluate the genetic diversity among isolates using the RAPD technique. Were used 10 random *primers* for RAPD analysis six isolates of the genus *Cladosporium* from coffee plants in different regions of state Minas Gerais. The % of genetic similarity was analyzed by the pattern of bands obtained by RAPD using the software UPGMA. The results showed that the isolates do not have identical genome, could be observed polymorphism with the *primers* used. These isolates were identified using amplification and sequencing of ITS region of rDNA. The alignment of the sequences ITS region showed maximum nucleotide identity of 94% with sequences deposited in GenBank *Cladosporium cladosporioides*, demonstrating that the sequencing of this region was an efficient method for identification of isolates.

Keywords: Molecular identification. *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vrie. Genetic diversity. RAPD (*Random amplified polymorphic*).

## 1 INTRODUÇÃO

O uso dos fungos como agentes de controle biológico e produtores de enzimas de interesse biotecnológico depende de uma caracterização adequada, possibilitando a discriminação de diversas linhagens de fungos filamentosos, através do conhecimento dos seus padrões fisiológicos, morfológicos e genéticos. Neste contexto, a caracterização também auxilia no processo de identificação, quando a espécie não está bem definida (FRUTOS *et al.*, 1994).

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 nucleicos, lignina, lipídeos e outros (MALLER, 2008).

Fungos filamentosos apresentam ainda grande potencial de produção de metabólitos de interesse farmacológico e biotecnológico. Em muitos casos, os taxonomistas têm dificuldades para determinar quais são as características que realmente definem um gênero ou uma espécie (GUARRO *et al.*, 1999). Nesse aspecto, técnicas moleculares de caracterização e identificação estão contribuindo para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies de fungos (GUEDES *et al.*, 2007). A análise de características morfológicas e genéticas fornece suporte para resolver questões originadas pela sistemática clássica na identificação das espécies, assim como permite a análise filogenética de gêneros e espécies relacionadas (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 1998).

A caracterização de fungos por estudos morfológicos é um processo que exige conhecimento, tempo e disponibilidade de material para crescimento das espécies em laboratório, bem como manter o cultivo dos mesmos. A

identificação de espécies baseada somente em características morfológicas e culturais tem limitações, uma vez que essas são influenciadas pelo ambiente, alterando o fenótipo de isolados fúngicos. Atualmente, com a utilização de técnicas moleculares através da análise dos ácidos nucleicos há um grande potencial para a diferenciação entre espécies e isolados (BENEDETTI *et al.*, 2008; MENEZES *et al.*, 2010).

A identificação decorre, inicialmente, de provas bioquímicas, porém o uso de técnicas de biologia molecular pode enriquecer o conhecimento a esse respeito, tendo como conseqüências um impacto significativo no nível de resolução taxonômica, na qualidade científica da pesquisa e na produtividade dos grupos de pesquisa, além de proporcionar soluções dos problemas de classificação, no que diz respeito à caracterização e à definição de novos táxons, em diversos grupos de microrganismos (LIMA *et al.*, 2008).

Nos últimos anos vêm sendo desenvolvidas técnicas baseadas na análise de ácidos nucleicos, visando tanto estudos mais preciosos da taxonomia quanto no estudo de fatores de controle da patogenicidade. Ao contrário dos métodos convencionais, essas técnicas proporcionam vantagens a fim de caracterizar, identificar e detectar microrganismos baseados na informação genética (DUVEILLER *et al.*, 1997).

As técnicas moleculares geralmente envolvem a extração de ácidos nucleicos da amostra e amplificação de regiões específicas do DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), permitindo o estudo e identificação de microrganismos (BORNEMAN & TRIPLETT, 1997). A tecnologia de PCR tem gerado diversas classes de marcadores moleculares que podem ser aplicados no estudo do DNA inteiro ou fragmentado. Um destes métodos foi denominado de RAPD, o qual é caracterizado pela reação da polimerase em cadeia, utilizando *primers* arbitrários (LIMA *et al.*, 2008). Esses métodos moleculares têm sido utilizados para caracterizar a diversidade entre isolados patogênicos e não

patogênicos a determinadas culturas e para determinar relações genéticas entre espécies (OLIVEIRA & COSTA, 2002).

Devido ao valor dos fungos filamentosos como agentes no controle biológico e como produtores de metabólitos de interesse biotecnológico, a caracterização destes é muito importante. A caracterização auxilia também o processo de identificação da espécie, quando não está bem definida (NEUVÉGLISE *et al.*, 1994). Recentes trabalhos demonstraram o *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries como um fungo bioprotetor da qualidade do café, além de ser um excelente produtor de pectinases. A caracterização molecular dos isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries ainda não foi realizada, o que torna essencial o desenvolvimento de pesquisas nessa área, a fim de se determinar o potencial desses isolados quanto à produção de pectinases, visando uma posterior aplicação na indústria de alimentos. Baseado neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil genético de isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e sequenciar a região ITS destes isolados visando a identificação molecular.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Instalação do experimento**

O experimento foi conduzido nos Laboratórios de Genética Molecular do Departamento de Biologia e no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Solos.

### **2.2 Condições de cultivo**

Os isolados utilizados nesse experimento foram originados de frutos do café e obtidos através da seleção de material coletado em três cidades produtoras do estado de Minas Gerais: Três Pontas, Lavras e Patrocínio (Tabela 1) no período de maturação dos frutos. Os frutos foram encaminhados para o laboratório da EPAMIG, onde foi realizado o plaqueamento e em seguida o isolamento, purificação e identificação morfológica dos isolados. Estes foram repicados para placas contendo meio de cultivo BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e incubados a 28°C. Para a obtenção do micélio para posterior extração do material genético, os isolados foram cultivados em erlenmeyers contendo 50mL de meio de cultivo BD (Batata-Dextrose) e incubados em shaker a 28°C durante 5 dias a 150 rpm.

Tabela 1 Identificação dos isolados quanto à origem

| <b>Isolado</b> | <b>Localidade</b> |
|----------------|-------------------|
| G080           | Três Pontas, MG   |
| G081           | Três Pontas, MG   |
| G082           | Três Pontas, MG   |
| G084           | Três Pontas, MG   |
| G087           | Patrocínio, MG    |
| G088           | Lavras, MG        |

### 2.3 Extração de DNA

A extração do DNA dos seis isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Specht *et al.*, (1982). O micélio crescido em meio líquido foi filtrado e lavado com água destilada e em seguida macerado com nitrogênio líquido. O pó do micélio triturado foi colocado em microtubos e adicionados de 600µL de tampão de extração (glicose, Tris-HCl, EDTA), sendo posteriormente incubados a 65°C por 20 minutos. Foram acrescentados 600µL de clorofórmio álcool-isoamílico (24:1), sendo os microtubos mantidos em gelo por 15 minutos e posteriormente centrifugados a 9000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e transferido para novos microtubos, os quais foram adicionados de 500µL de isopropanol gelado, até o DNA ficar visível (+/- 10 min). Em seguida o DNA foi centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com 100µL de etanol 70%. O etanol foi descartado e os microtubos novamente centrifugados (400 rpm/1min) para remoção de restos do mesmo, sendo o *pellet* mantido em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos e posteriormente ressuscitado em 50µL de água ultra-pura com acetato de amônio 7M. O DNA foi incubado em gelo por 1h e após

esse período os microtubos foram centrifugados (12000 rpm/20min), sendo o sobrenadante transferido para novos tubos, nos quais foram adicionados igual volume de isopropanol (600 $\mu$ L) e mantidos no freezer *overnight*. O material foi centrifugado (12000 rpm/5 min), o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com etanol 70 % e ressuspendido em 50 $\mu$ L de Tris-HCl 10 mM.

#### 2.4 Análise qualitativa do DNA

A qualidade e quantidade do DNA total dos fungos foi avaliada em gel de agarose 0,8%, utilizando-se o marcador de massa molecular 100pb Ladder (Invitrogen). A eletroforese foi realizada a 60 V durante 1h utilizando-se o tampão de corrida TBE 1X (Tris-borato 9mM e EDTA 1mM).

#### 2.5 Amplificação da região ITS do rDNA

A amplificação da região ITS dos isolados de *Cladosporium cladosporioides* utilizando os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') foi realizada em um volume final de 50 $\mu$ L. Cada reação de amplificação foi composta de 1 $\mu$ L do DNA genômico, 5 $\mu$ L de tampão, 1 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 1 $\mu$ L de dNTP, 0,25 $\mu$ L de *Taq* DNA Polimerase e 40 $\mu$ L de água ultra-pura. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador, em 35 ciclos, os quais constituíram-se de uma etapa de desnaturação (94°C/2 min e 94°C/45s), uma etapa de anelamento a 55°C por 30s e uma etapa de extensão a 72°C por 45s, sendo mantida uma temperatura de 4°C ao final do 35º ciclo.

## 2.6 Purificação do fragmento amplificado

A região ITS amplificada por meio da PCR, foi purificada para posteriormente ser seqüenciada. Para isto, 50µL de cada amostra foi transferida para microtubos de 1,5 mL, nos quais foram adicionados 1,5µL de NaCl (5M) e 2,5 volumes de isopropanol e em seguida incubados a -20°C por 16h. Após este período, as amostras foram centrifugadas (12000rpm/20min.) a 4°, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* lavado com etanol 70%. O DNA purificado foi ressuspendido em 20µL de água ultra-pura e a qualidade e quantidade checados em gel de agarose 1,5%.

## 2.7 Amplificação do DNA total por RAPD

A amplificação foi baseada em método descrito por Williams *et al.* (1990). A PCR para amplificação do DNA dos isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries foi realizada utilizando-se 10 oligonucleotídeos iniciadores (AW 13, AW 19, AL 08, AQ 14, AX 12, AV 11, AT 15, AX 1, AX 4, AX 7). As análises de RAPD foram realizadas em um volume final de 15 µL, sendo cada reação constituída de 2µL de tampão, 0,25µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,66µL de dNTP, 2,25µL do *primer* arbitrário, 0,2µL de *Taq* DNA Polimerase e 8,64µL de água ultra-pura. Os ciclos constituíram-se de: 2 minutos iniciais para a desnaturação das fitas de DNA a 94°C, 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 37°C, 1 minuto a 72°C, seguido de uma extensão final de 72°C por 2 minutos. Os produtos de PCR foram corados com 1µL de SYBER Green e analisados em gel de agarose a 1%. A análise dos resultados foi realizada pelo calculo do coeficiente de Jaccard (Rohlf, 1951) usando o programa computacional NTSYS (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) versão 2.1 pc. Os fragmentos polimórficos foram analisados visualmente e ordenados em uma

matriz binária de dados, caracterizada pela presença de banda (1) e ausência (0) dela. A matriz de dados binários (retangular) foi então analisada pelo UPGMA.

## **2.8 Sequenciamento da região ITS**

Para o sequenciamento da região do espaçador interno transcrito (ITS) do DNA ribossomal (rDNA) foi utilizado o aparelho Mega Bace 1000, de acordo com a metodologia descrita por Sanger et al., (1977), sendo as sequências posteriormente comparadas e alinhadas com outras sequências homólogas no banco de dados utilizando o programa Blast (Basic Local Alignment Search Tool) disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análise do DNA genômico dos seis isolados do *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries

O DNA genômico extraído dos seis isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries (Figura 1), foi usado como molde para amplificação da região ITS do rDNA utilizando os *primers* ITS1 e ITS4. Para Fungaro (2000) o rDNA presente em todos os organismos, evolui rapidamente, sendo portanto apropriado para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. Na figura 7, observa-se nitidamente a presença de bandas na parte superior do gel, as quais se referem às bandas de DNA total e logo abaixo pode-se observar bandas de RNA, uma vez que não foi utilizada RNase que degrada as moléculas de RNA durante a extração do DNA.

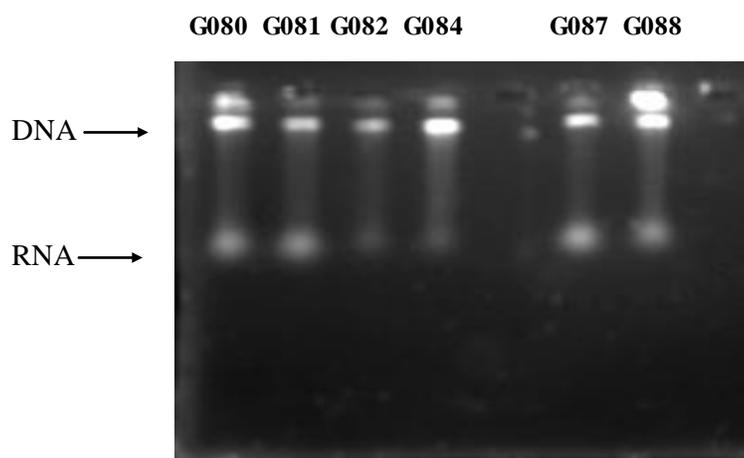


Figura 1 Gel de eletroforese do DNA genômico extraído de isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries

### 3.2 Análise dos produtos de amplificação da região ITS do rDNA

A Figura 2 mostra o gel de agarose (1,5%) dos produtos amplificados utilizando os *primers* ITS 1 e ITS 4. Apenas um fragmento de DNA foi observado para cada um dos seis isolados, confirmando a amplificação da região ITS em todos eles. Os fragmentos amplificados visualizados na mesma posição no gel de agarose podem ser considerados de mesmo tamanho (aproximadamente 600 pb). A banda inferior mais fraca observada em todos os isolados, provavelmente deve-se aos restos de *primers* da reação. Costa (2011) também verificou que isolados de *Aspergillus niger* tiveram amplificados somente fragmentos do DNA genômico correspondentes à região ITS 1 e ITS 4 com bandas de aproximadamente 600 pb, assim como encontrado no presente trabalho.

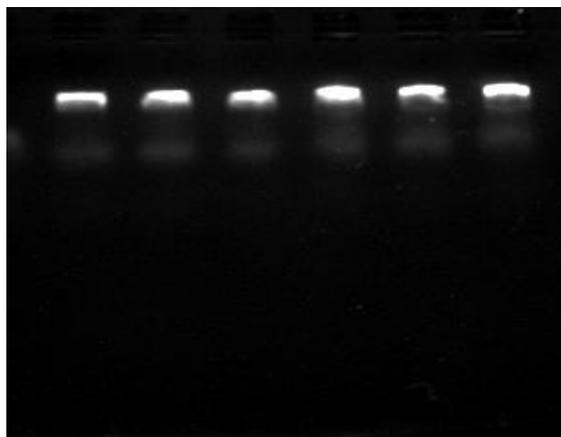


Figura 2 Produtos da amplificação da região ITS do rDNA de seis isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries

### 3.3 Análise dos fragmentos purificados da região ITS do rDNA

A região ITS, amplificada por meio da PCR, foi purificada para posteriormente ser seqüenciada, permitindo a comparação desses isolados com base nesta região. O tamanho dos fragmentos amplificados foi de aproximadamente 600 pares de bases (Figura 3). De acordo com Carbone & Kohn (1997), o fato de essas regiões serem relativamente curtas (500 a 800pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permite que sejam amplificadas e seqüenciadas com facilidade. A purificação deve ser feita para remoção de vestígios de *primers* da reação de PCR e ainda para facilitar o seqüenciamento. A figura 9 mostra os fragmentos purificados dos isolados, confirmando a qualidade da purificação.

G080 G081 G082 G084 G087 G088 M

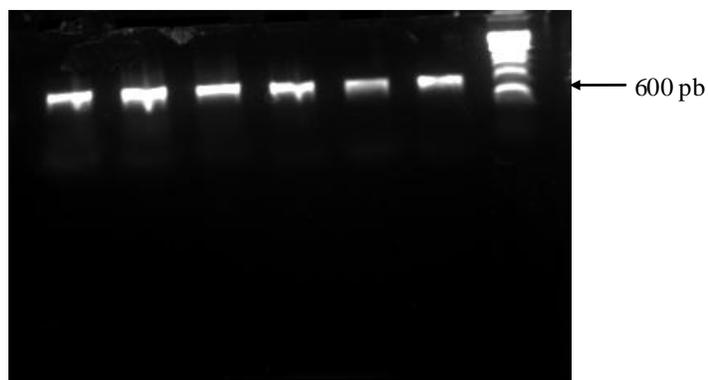


Figura 3 Produtos purificados da região ITS do rDNA de seis isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries

As amostras então purificadas, quando submetidas ao seqüenciamento da região ITS do rDNA e alinhadas com outras seqüências no banco de dados mostraram identidade máxima de nucleotídeos de 94% com seqüências depositadas no GenBank de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries

(Tabela 2), demonstrando que o sequenciamento da região ITS foi um método eficiente na identificação da espécie. De acordo com Fungaro (2000) existe um grande número de sequências ITS de diferentes fungos que estão atualmente disponíveis nos bancos de dados de sequências de nucleotídeos, facilitando a identificação de espécies. Menezes et al., (2010) também verificaram que o sequenciamento de bases da região ITS foi um eficiente método para identificação e separação de isolados de *Trichoderma* e *Fusarium*. Cardoso *et al.*, (2007) não detectaram variação na sequência ITS entre *Penicillium expansum* e *Penicillium griseoroseum*. Os resultados mostraram que a comparação da sequência de nucleotídeos da região ITS entre essas espécies não revelaram discriminação satisfatória devido ao baixo grau de sua variabilidade.

Tabela 2 Isolados de *Cladosporium cladosporioides* utilizados na comparação de similaridade genética com os isolados em estudo

| <b>Isolado</b>                                       | <b>Identidade (%) com<br/>sequência do<br/>GenBank</b> | <b>Número de<br/>acesso*</b> | <b>Autor</b>              |
|--|--|------------------------------|---------------------------|
| <i>C. cladosporioides</i><br>UFMGCB 3794             | 92   | HQ 533783                    | Gonçalves et al.,<br>2010 |
| <i>C. cladosporioides</i><br>LPSC 1088               | 94   | JF 949719                    | Llorente et al., 2011     |
| <i>C. cladosporioides</i><br>ATT 097                 | 91   | HQ 607834                    | Rodrigues et al.,<br>2010 |
| <i>C. cladosporioides</i>                            | 90   | HM 008931                    | Kim & Kim, 2010           |
| <i>C. cladosporioides</i><br>LS3 - 2009 <sup>a</sup> | 91   | HQ 660443                    | Yang & Zang, 2010         |

### 3.4 Análise da variabilidade genética do DNA genômico amplificado dos isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries pela técnica de RAPD

As Figuras 4, 5, 6 e 7 mostram os fragmentos de DNA amplificados por RAPD dos isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries utilizando os primers AW 19, AL 08, T 05, AT 15, AW 13, AV 11, AX 12, AX 1, AX 4, AX 7.

Muitas vezes é necessária a utilização de outras técnicas para detectar polimorfismos, principalmente quando se trata de isolados de uma mesma espécie. A PCR é uma técnica de amplificação de fragmentos de DNA que pode ser modificada ou ajustada a fim de atender os objetivos do estudo. Além da comparação da sequência da região ITS, outra técnica denominada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) pode ser utilizada para detectar polimorfismos entre populações de uma mesma espécie, a qual também foi desenvolvida neste trabalho. Azevedo *et al.*, (2000) investigando a variabilidade molecular entre isolados de *Paecilomyces fumosoroseus* observou que a variabilidade nos perfis de RAPD foi suficiente para discriminar todos os isolados dessa espécie.

Na Figura 4 observa-se que o isolado 82 apresentou uma banda diferenciada dos demais, utilizando o primer AW 19, indicando que esta é uma banda polimórfica. Os isolados 80, 81, 84 e 88 apresentaram bandas bem nítidas, apenas o isolado 87 apresentou bandas com pouco produto de amplificação para esse mesmo primer. Todos os isolados apresentaram padrões de bandas semelhantes quando utilizado o primer AL 08, observando-se ainda a presença de uma banda monomórfica, ou seja, esta banda estava presente em todos os isolados, sugerindo a existência de possível semelhança entre estes.

G080 G081 G082 G084 G087 G088 G080 G081 G082 G084 G087 G088

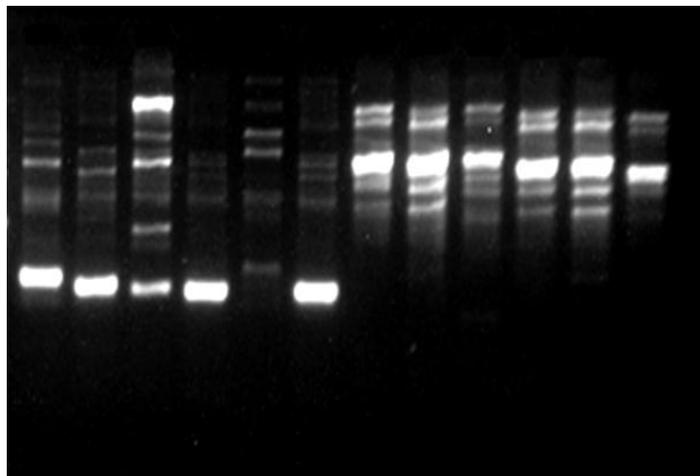


Figura 4 Gel de eletroforese de produtos amplificados de RAPD de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries com os primers AW19 e AL08

As amostras amplificadas com o *primer T 05* (Figura 5) apresentaram uma banda intensa, semelhante em todos os isolados (exceto no 81), sugerindo a presença de sequências semelhantes complementares ao *primer* no genoma das amostras em estudo. O isolado 81 apresentou uma diferenciação na posição da banda, que pode ter sido em virtude de problemas ocorridos durante a corrida eletroforética. Esse mesmo isolado apresentou ainda uma banda menos intensa, diferenciada dos demais, o que pode ser observado também para amostra 82. Este resultado pode indicar alguma diferenciação no genoma desses isolados quando comparado com os demais. De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1998), bandas pouco consistentes ocorrem com todos os tipos de marcadores moleculares, sendo atribuídas, em ensaios RAPD, ao baixo poder do *primer* em discriminar sítios de amplificação distintos, à competição entre diferentes sítios de amplificação por substrato e enzima e aos problemas na padronização das condições de amplificação. As amostras amplificadas com o *primer AT 15*

apresentaram o mesmo padrão de bandas exceto para o isolado 82 que apresentou uma banda diferenciada das demais (Figura 5).

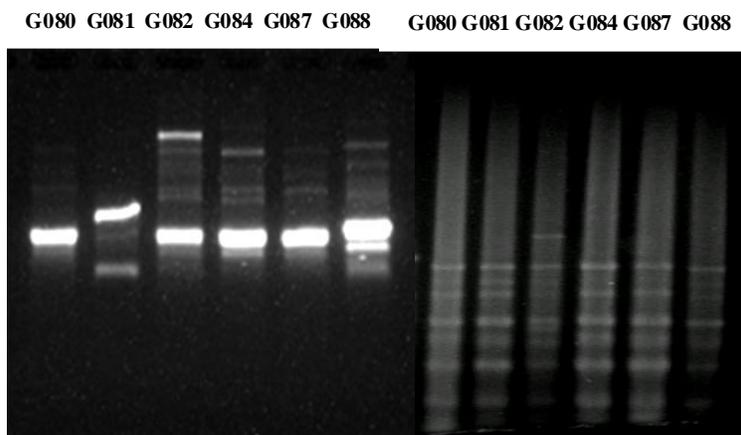


Figura 5 Gel de eletroforese de produtos amplificados de RAPD de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries com os primers *T 05* e *AT 15*

Os primers *AW 13*, *AV 11* e *AX 12* também geraram um mesmo padrão de bandas em todos os isolados (Figura 6). O isolado 82 também apresentou uma banda diferenciada com o primer *AV 11*, o que sugere a existência de maior polimorfismo genético nesse isolado com relação aos demais. Já as amostras amplificadas com o primer *AX 7* apresentaram bandas intensas e semelhantes em todos os isolados com exceção do isolado 81, que apresentou uma banda menos intensa (Figura 7). O mesmo pôde ser observado quando se utilizou o primer *AX 1*, com exceção dos isolados 82 e 84 que também apresentaram banda menos intensa. Os produtos amplificados com o primer *AX 4* apresentaram duas bandas polimórficas bem nítidas e semelhantes nos seis isolados, com exceção do 81, no qual não se observa aparecimento da primeira banda.

G80 G81 G82 G84 G87 G88

G80 G81 G82 G84 G87 G88 G80 G81 G82 G84 G87 G88

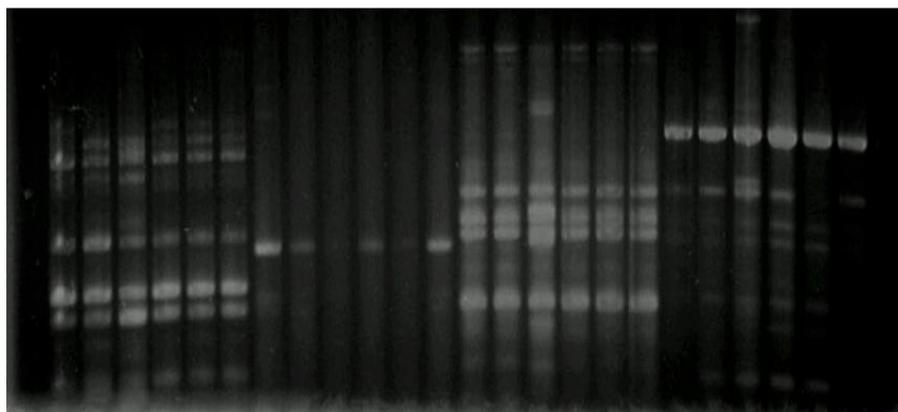


Figura 6 Gel de eletroforese de produtos amplificados de RAPD de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries com os primers AW 13, AV 11 e AX 12

G80 G81 G82 G84 G87 G88 G80 G81 G82 G84 G87 G88

G80 G81 G82 G84 G87 G88

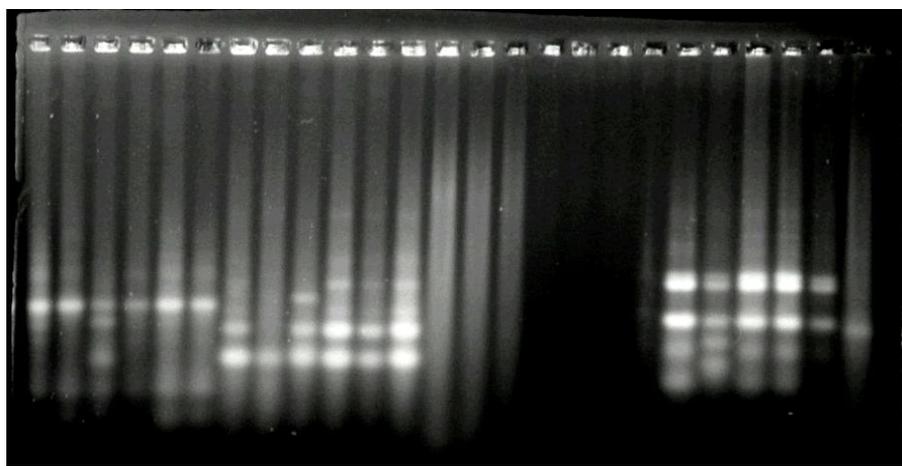


Figura 7 Gel de eletroforese de produtos amplificados de RAPD de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries com os primers AX 1, AX 4 e AX 7

A partir da análise das bandas polimórficas obtida com os 10 *primers* (*AW 19, AL 08, T 05, AW 13, AV 11, AX 12, AT 15, AX 1, AX 4 e AX 7*) pela análise RAPD, foi gerada uma matriz de similaridade genética (Tabela 3), a qual foi analisada pelo programa computacional NTSYS gerando um dendograma que mostra a similaridade genética e cujo agrupamento de dados foi obtido pelo método UPGMA. De acordo com o teste de similaridade, 5 agrupamentos puderam ser observados conforme mostra a Figura 8.

Tabela 3 Matriz de similaridade genética entre 6 isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries

|             | <b>G080</b> | <b>G081</b> | <b>G082</b> | <b>G084</b> | <b>G087</b> | <b>G088</b> |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>G080</b> | 1           |             |             |             |             |             |
| <b>G081</b> | 0,88        | 1           |             |             |             |             |
| <b>G082</b> | 0,74        | 0,75        | 1           |             |             |             |
| <b>G084</b> | 0,9         | 0,85        | 0,76        | 1           |             |             |
| <b>G087</b> | 0,83        | 0,81        | 0,75        | 0,85        | 1           |             |
| <b>G088</b> | 0,74        | 0,69        | 0,67        | 0,77        | 0,73        | 1           |

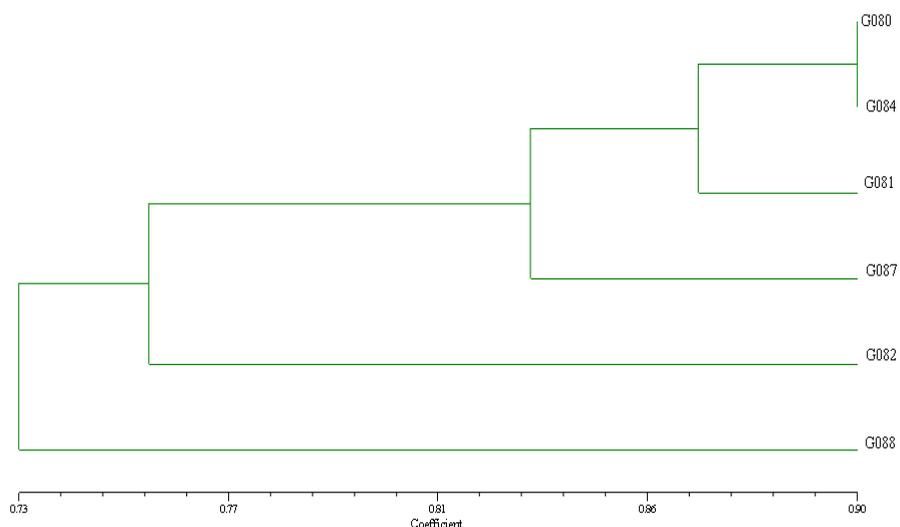


Figura 8 Dendrograma gerado a partir dos dados de similaridade genética de seis isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries por meio de marcadores RAPD

Foi possível concluir que os isolados G080 e G084 estão mais próximos, uma vez que apresentaram menor distância genética com 90% de similaridade constituindo um único grupo. O isolado G081 constituiu um 2º grupo com 86,5% de similaridade com relação ao 1º grupo. Já o isolado G087 constituiu um 3º grupo com 81% de similaridade em relação ao 2º grupo (G081). O isolado G088 foi o que apresentou maior distância genética com relação aos demais como pode ser observado, por exemplo, entre os isolados G082 e G088, os quais se mostraram menos semelhantes, com apenas 67 % de similaridade (Tabela 3), demonstrando a existência de maior variabilidade genética. O isolado G088 apresentou ainda 69% de similaridade com o isolado G081.

A partir da análise de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) utilizando 10 *primers* de seqüências arbitrárias foi possível verificar a existência de polimorfismo genético entre os seis isolados do *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. O polimorfismo genético gerado pelos

marcadores RAPD são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado em um dos genótipos em relação à ausência desse mesmo fragmento em outro genótipo (JIMÉNEZ & COLLADA, 2000). Em trabalhos realizados por Figueiredo et al., (2003) sobre caracterização molecular de microrganismos do ecossistema agrícola do cerrado, a técnica de RAPD-PCR se mostrou eficiente, revelando elevado grau de polimorfismo dos produtos amplificados do DNA e se mostrando útil para análises da variabilidade genética e identificação de grande número de isolados de *Acremonium strictum*. Silva-Mann et al., (2002) avaliando a variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, encontrou valor de similaridade de 51,7%, confirmando a potencialidade da técnica RAPD para diferenciar tais fungos.

A existência de variabilidade pode ser explicada pelo fato de os isolados do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries terem origens geográficas diferentes exercendo uma possível influência. Entretanto, Colauto et al., (2002), ao caracterizarem geneticamente 5 isolados do basidiomiceto *Agaricus blazei* por RAPD, verificou que, embora os mesmos apresentassem origens diferentes, não possuíam divergência genética entre si. Teixeira et al., (2004) avaliando a diversidade genética de isolados do patógeno *Acremonium strictum* obtidos de sementes de milho, provenientes de diferentes regiões produtoras brasileiras, observou que, na maioria dos casos isolados de *A. strictum* provenientes de um mesmo estado apresentaram perfis genotípicos mais variados do que isolados oriundos de estados diferentes. Este fato deveu-se, provavelmente, à utilização de isolados obtidos de genótipos hospedeiros com base genética diferente, exercendo alguma influência sobre o comportamento dos próprios isolados, mais que a origem geográfica dos mesmos.

#### 4 CONCLUSÕES

- a) a análise por RAPD mostrou que os genomas dos isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries não são idênticos;
- b) os isolados G080 e G084 apresentam maior similaridade genética;
- c) o isolado G088 esta mais distante geneticamente dos outros isolados;
- d) o sequenciamento da região ITS mostrou que os isolados pertencem à espécie *Cladosporium cladosporioides*.

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, A. C. S.; FURLANETO, M. C.; SOSA-GÓMEZ, D, R. *et al.* Molecular characterization of *Paecilomyces fumosoroseus* (*Deuteromycotina: Hyphomycetes*) isolates. **Scientia Agricola**, vol. 57, nº4, Piracicaba, out/dez, 2000.
- BENEDETTI, T.; SILVA, T. M. B. da.; STEFFEN, R. B. *et al.* **Metodologia para a extração de DNA de *Trichoderma* sp.**, 2008, Santa Maria – RS.
- BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2647–2653, 1997.
- CARBONE, I.; KOHN, L. Ribosomal DNA sequences divergence within transcribed spacer 1 of the sclerotiniaceae. **Mycological**, v.85, p. 415-427, 1997.
- CARDOSO, P. G.; QUEIROZ, M. V. de; PEREIRA, O. L. *et al.* Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungo *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2007, p. 71-77, Viçosa-MG.
- COLAUTO, N. B.; DIAS, E. S.; GIMENES, M. A. *et al.* Genetic characterization of isolates of the basidiomycete *Agaricus blazei* by RAPD. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 131-133, 2002.
- COSTA, L. M. A. S. **Caracterização de isolados de *Aspergillus niger* quanto à produção de ácido cítrico e à expressão de genes da citrato sintase** (Tese – Doutorado), 2011, 92p. Universidade Federal de Lavras \_ UFLA, Lavras.
- DUVEILLER, E.; FUCIKOVSKI, L.; RUDOLPH, K. (Ed.). **The bacterial disease of wheat: concepts and methods of disease management**. México: CIMMYT, 1997, p. 5-23.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. p.220. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

- FIGUEIREDO, J. E. F.; PAOLI, H. C. de; COELHO, V. T. da S. *et al.* **Caracterização Molecular de Microrganismos do Ecossistema Agrícola do Cerrado III – *Acremonium strictum***. Comunicado Técnico 69, Embrapa, Outubro, 2003, Sete Lagoas, MG.
- FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.14, p. 12-16, 2000.
- GONÇALVES, V. N.; VAZ, A. B.; ROSA, C. A. *et al.* **Biodiversity of fungal community in Antarctic lakes**. Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 2010.
- GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. **Developments in fungal taxonomy**. Microbiology Reviews, 1999, 12:454-500.
- GUEDES, R. I. C.; COUTINHO, R. M. P.; SILVA, S. *et al.* **Análise química e genômica para identificação de três espécies de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus***. Associação Brasileira de Química: Bioquímica e Biotecnologia, setembro, 2007, Natal – RN.
- JIMÈNEZ, L.; COLLADA, C. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. **Methods in Enzimology**. v.2, p. 237 – 248, 2000.
- KIM, J. J.; KIM, G. H. Fungal degradation of bamboo products. **Division of Environmental Sciences & Ecological Engineering**, Korea University, Korea, 2010.
- LIMA, A. A.; QUEIROZ, P. R.; SANTOS, C. F. *et al.* **Identificação molecular de linhagens de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* utilizando marcadores RAPD**. Brasília – DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.
- LIORENTE, C.; SAPARRAT, M.; BALATTI, P. *et al.* ***Cladosporium cladosporioides* polyketide synthase genes**. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional La Plata, Instituto de Fisiología Vegetal, Buenos Aires, Argentina, 2011.
- MALLER, A. **Produção, Purificação e Caracterização do Complexo Pectinolítico do Fungo *Aspergillus niveus*** (Dissertação). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2008. 98p.

MENEZES, J. P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I. *et al.* Genetic variability in rDNA ITS region of *Trichoderma* spp. (biocontrol agent) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi* isolates. **Ciênc. agrotec.** v. 34, nº1, Lavras, Jan./Fev., 2010.

NEUVÉGLISE, C.; BRYGOO, Y.; VERCAMBRE, B. *et al.* Comparative analyses of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. **Mycological Research**, v.98, p. 322-328, 1994.

OLIVEIRA, V. C. de; COSTA, J. L. S. da. Restriction analysis of rDNA (ARDRA) can differentiate *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* from *F. solani* f. sp. *Glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, vol.27, nº6, Brasília, Nov/dez., 2002.

RODRIGUES, A.; MUELLER, U. G.; COPPER, M. **Ecology of microfungal communities in gardens of fungus-growin ants (Hymenoptera: Formicidae): a year-long survey of three species.** Department of Biological Sciences, UESC - Santa Cruz State University, Ilheus, Bahia, Brazil, 2010.

SILVA-MANN, R.; SALGADO, K. C. C.; VIEIRA, M. G. G. C. *et al.* Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, vol. 27, nº1, 2002, Lavras, MG.

SOSA-GÓMEZ, D. R., TIGANO, M. S., ARANTES, O. M. N. Caracterização de entomopatogêneos. In: Alves, S. B. (Ed.). **Controle Biológico de inseto**, 1998, Piracicaba: FEALQ, p.731-763.

SPECHT, C. A.; DIRUSSO, C. C.; NOVOTNY, C. P. *et al.* A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Analytical Biochemistry**, v. 119, nº1, p. 158-163, 1982.

TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M. das G. G. C.; MACHADO, J. da C. Marcadores RAPD na Análise da Diversidade Genética de Isolados de *Acremonium Strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, p. 651-655, 29 (6), nov./dez., 2004.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J. *et al.* **DNA polymorphism and amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** Nucleic Acid Research 18:6531-6535. 1990.

YANG, G.; ZHANG, C. Analysis of symbiotic fungi in pseudobulb of *Changnienia amoena* *Orchidaceae*. **Agriculture & Biotechnology**, Biotechnology Institute, Zhengjiang University, Hangzhou, China, 2010.

### **CAPÍTULO 3**

**Produção de pectinases por isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.)  
*de Vries***

## RESUMO

Os setores agroindustriais e de alimentos produzem uma quantidade considerável de resíduos, os quais constituem uma fonte de carbono para a produção de enzimas por diversos microrganismos, incluindo as pectinases. Os fungos em função de suas características de reprodução e crescimento adaptam-se a uma grande variedade de substratos, podendo ser utilizados como agentes de fermentação, para a produção dessas enzimas. Nos últimos anos tem-se observado um grande interesse em produzir tais enzimas por fermentação em estado sólido, entretanto, quando se trata de processo em grande escala, a fermentação submersa é a mais utilizada. Por isso, o estudo de parâmetros que viabilizem a utilização desse processo associado ao uso de resíduos agroindustriais como fonte de pectina é muito importante. Alguns trabalhos demonstraram o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries como um bom produtor de pectinases. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de produção das enzimas pectinametilesterase (PME), poligalacturonase (endo- e exo- PG) e pectina liase por quatro isolados do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, utilizando fermentação submersa e resíduos agroindustriais como casca de café, laranja, maracujá e uva, os quais foram avaliados isoladamente, sendo adicionados ao meio como fonte de pectina nas concentrações de 0,1; 0,25 e 0,5%. A atividade enzimática específica foi expressa em unidades de atividade por grama de proteína (U/g). A casca de café demonstrou ser uma fonte menos promissora para a síntese de pectinases por *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. O isolado G088 resultou em maior índice de PME e os isolados G080 e G084 promoveram maior atividade de PL, ambos utilizando como substrato a casca de uva na concentração 0,5%. O isolado G084 apresentou índices médios superiores para a produção da enzima exo-PG utilizando como substrato a casca de uva na concentração 0,5%. O isolado G088 resultou em maior atividade da enzima endo-PG utilizando como substrato a casca de laranja na concentração de 0,1%. A diferença entre os isolados quanto à produção de pectinases sugere uma diferença genética entre eles.

Palavras-chave: Atividade enzimática. *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. Resíduo agroindustrial.

## ABSTRACT

The agroindustrial sectors and of food produce a considerable amount of waste, which constitutes a carbon source for enzyme production by various microorganisms, including pectinases. Fungi due to their reproductive characteristics and growth adapt to a wide variety of substrates and can be used as leavening agents, for the production these enzymes. In recent years there has been a great interest in producing such enzymes by solid state fermentation, however, when it comes to process large scale submerged fermentation is the most used. Therefore, the study of parameters that allow the use of this process associated with the use of agroindustrial residues as a source of pectin is very important. Some studies showed the fungus *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries as a good producer of pectinases. Therefore, this study aimed to evaluate the production potential of pectinmethylesterase (PME), polygalacturonase (endo-and exo-PG) and pectin lyase by four isolates *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries using submerged fermentation and agroindustrial residues such as coffee husks, orange, passion and grapes, which were evaluated separately, being added to the medium as a source of pectin concentrations of 0,10; 0,25 and 0,50%. The specific enzyme activity was expressed in activity units per gram of protein (U/g). Coffee husk proved to be a less promising source for the synthesis of pectinases by *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. The isolated G088 resulted in a higher rate of PME and isolated G080 and G084 promoted higher PL activity, both using as substrate the bark of grape at 0,5% concentration. The isolated G084 had higher average rates for production of the enzyme exo-PG using as substrate grape skin in the concentration 0,5%. The isolated G088 resulted in increased activity endo-PG using as substrate orange peel at concentration 0,1%. The difference between the isolates in the production of enzymes suggests a genetic difference between them.

Keywords: Enzymatic activity. *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. Agro-industrial residue.

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o desenvolvimento de processos biotecnológicos, vinculados com setores importantes da economia, tem conquistado um espaço importante. As produções de metabólitos por microrganismos de interesse industrial permitem o reaproveitamento de resíduos agroindustriais como fonte de matéria prima em processos biotecnológicos específicos (FERNÁNDEZ, 2009).

Depois dos antibióticos, as enzimas constituem o mais importante grupo de produtos biológicos de necessidade humana. Inúmeros processos industriais, sobretudo nas áreas da biotecnologia industrial, ambiental e de alimentos, utilizam a tecnologia das enzimas em várias de suas etapas. Atualmente, as enzimas hidrolíticas são as mais utilizadas nos processos industriais, sendo aplicadas na degradação de várias substâncias naturais. De forma geral, elas são usadas em grande escala nas indústrias têxteis, de detergentes, alimentícia, de papel e de couro (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A utilização de enzimas em processos industriais tem aumentando consideravelmente nos últimos anos, especialmente nas indústrias de alimentos, bebidas entre outras (FONTANA, 2009).

As enzimas microbianas são classes de proteínas responsáveis pela reciclagem de matérias orgânicas solúveis e insolúveis na natureza. Dentre essas enzimas as pectinases apresentam um destaque no setor industrial (SANTI, 2005). A hidrólise biológica da pectina é importante tanto do ponto de vista econômico como ecológico e a catálise enzimática da molécula tem sido extensivamente estudada devido ao seu envolvimento com a indústria de alimentos, dentre outras (SANTOS *et al.*, 2008).

Na busca de soluções alternativas para o problema do descarte dos resíduos, muitas indústrias têm optado pelo uso de microrganismos como

agentes redutores de matéria orgânica desses materiais ou para a eliminação ou redução de compostos tóxicos. Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma grande variedade de substratos, entre eles, efluentes de indústrias processadoras de alimentos, resíduos agrícolas e agroindustriais (TAVARES *et al.*,1998).

As enzimas pectinolíticas, ou pectinases atuam sobre substâncias pécnicas, que fazem parte da composição da parede celular dos vegetais, provocando a sua despolimerização ou desesterificação (FONTANA, 2009). Estas podem ser sintetizadas por bactérias, fungos e leveduras. Portanto para que a aplicação das pectinases se torne viável, é essencial o estudo tanto de parâmetros que viabilizem sua produção quanto de condições adequadas ao seu uso (CORDEIRO & MARTINS, 2009; MENEZES *et al.*, 2006). As pectinases são muito utilizadas nas indústrias de sucos de frutas para reduzir viscosidade e aumentar a eficiência de filtração e de clarificação, no tratamento preliminar da uva em indústrias vinícolas, na extração de óleos vegetais e no tratamento e degomagem de fibras naturais para indústria têxtil e de papel (SANTOS *et al.*, 2008).

Atualmente, o alto custo na produção enzimática é, talvez, um dos maiores obstáculos na comercialização de novas enzimas. Entretanto, a otimização das condições de cultivo, aliada à escolha de linhagens de microrganismo apropriadas, pode levar a uma melhor produção enzimática, além de reduzir os custos de produção (MENESES, 2007). Comparando-se com outras enzimas, poucos trabalhos têm sido reportados sobre a produção de pectinases por via biotecnológica. É importante considerar ainda a crescente utilização de resíduos agroindustriais visando reduzir não só os custos de produção, como também o desenvolvimento de processos que não venham a agredir o meio ambiente (RIVAS *et al.*, 2004). Recentes trabalhos identificaram o *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries como um bom produtor de

pectinases (CARVALHO; COSTA; MENESES, 2007). Por isso, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de produção de enzimas pectinolíticas por isolados desse fungo, utilizando como substrato, diferentes resíduos agroindustriais em fermentação submersa.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Caracterização dos substratos utilizados no meio de fermentação**

#### **2.1.1 Instalação do experimento**

Os resíduos das frutas (laranja, maracujá e uva) foram adquiridos no comércio local do município de Lavras e a casca de café foi adquirida no Pólo do Café na Universidade Federal de Lavras. A casca de café utilizada no experimento constituiu-se de material seco, obtida do processamento via seca. O resíduo da laranja constituiu-se de casca, albedo e bagaço. Já o resíduo do maracujá constituiu-se de casca e albedo e da uva somente a casca. Tais resíduos foram manipulados no Laboratório Central de Análises do Departamento de Ciência dos Alimentos, os quais foram submetidos à processo de secagem em estufa à 60° C e em seguida triturados e moídos. As análises de composição centesimal, açúcar e pectina totais também foram realizadas no Laboratório Central de Análises do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA.

#### **2.1.2 Metodologias analíticas para os substratos**

##### **2.1.2.1 Umidade**

Determinada pela perda de peso em estufa regulada a 105°C até peso constante de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (1990).

#### **2.1.2.2 Extrato etéreo**

O extrato etéreo ou lipídeos totais foram determinados pelo método de extração contínua utilizando éter etílico como solvente em aparelho tipo Soxhlet segundo AOAC (1990).

#### **2.1.2.3 Proteína bruta**

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Micro-Kjeldahl descrito na AOAC (1990).

#### **2.1.2.4 Fibra bruta**

Determinada por meio da hidrólise ácida, segundo AOAC (1990).

#### **2.1.2.5 Resíduo mineral fixo**

Determinado pelo método gravimétrico com aquecimento em mufla a 550°C, segundo metodologia descrita pela AOAC (1990).

#### **2.1.2.6 Determinação de açúcares totais**

Determinado pelo método de Antrona de acordo com a metodologia descrita por Dische (1962), sendo os resultados expressos em g/100g.

### **2.1.2.7 Determinação de pectinas total e solúvel**

Determinada por método colorimétrico de acordo com a técnica descrita por Bitter & Muir (1962), sendo os resultados expressos em mg/100g.

## **2.2 Produção de enzimas e determinação da atividade enzimática**

### **2.2.1 Instalação do experimento**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia da EPAMIG e no Laboratório Central de Análises do Departamento de Ciência dos Alimentos na Universidade Federal de Lavras \_ UFLA.

### **2.2.2 Microrganismo e condições de cultivo**

#### **2.2.2.1 Fermentação submersa**

O microrganismo usado neste estudo foi o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries previamente isolado de frutos do café colhidos em estado de maturação avançada (Figura 1) e o tipo de fermentação avaliada foi a “submersa”. Quatro isolados obtidos de diferentes localidades (Tabela 1) foram avaliados quanto à atividade enzimática. Uma suspensão de esporos contendo cerca de  $10^6$  esporos/mL foi transferida para meio de cultura (Solução de Manachini) contendo: 0,2g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,01g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,09g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1g de extrato de levedura. A solução foi suplementada de pectina obtida pela adição de resíduos agroindustriais ricos em pectina, previamente secos e moídos, os quais constituíram-se de casca de café, laranja, maracujá e uva, avaliados isoladamente nas concentrações de

0,1%, 0,25% e 0,5% em substituição à pectina. Tais concentrações foram estabelecidas através da realização de pré-testes. As culturas permaneceram sob agitação constante a 100rpm e temperatura de 28°C em shaker durante 5 dias (Figura 2).

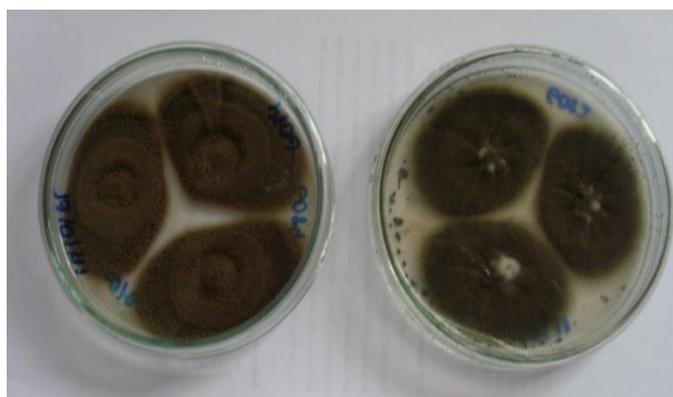


Figura 1 Isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries

Tabela 1 Identificação dos isolados quanto à origem

| <b>Isolado</b> | <b>Localidade</b> |
|----------------|-------------------|
| G080           | Três Pontas, MG   |
| G082           | Três Pontas, MG   |
| G084           | Três Pontas, MG   |
| G088           | Lavras, MG        |



Figura 2 Condições de cultivo de isolados do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries

### 2.2.3 Padronização da concentração de inóculo

A concentração de inóculo foi padronizada através da contagem de esporos em câmara de Neubauer. Os esporos foram coletados com o auxílio de bastão de vidro e ressuspensos em água destilada estéril, sendo retirada uma alíquota para contagem dos esporos na câmara de Neubauer (Figura 3). Suspensões contendo cerca de  $10^6$  esporos/mL foram então utilizadas como inóculo. A contagem do nº de esporos/mL foi dada pela fórmula:  $\text{esporos/mL} = n \times 25 \times 10^4$ , onde:

$n$  = número médio de esporos contados por campo

25 = número de quadrantes na câmara

$10^4$  = fator da câmara

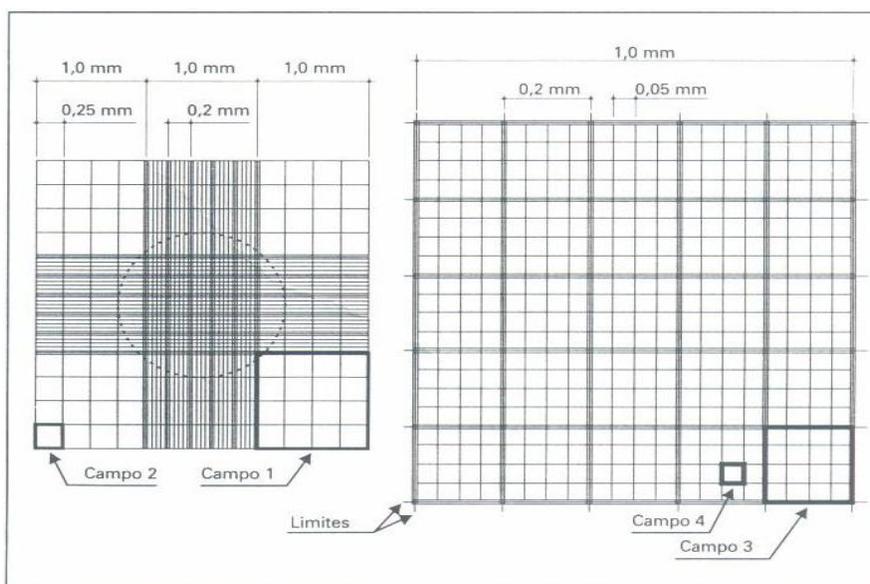


Figura 3 Câmara de Neubauer com os respectivos campos de contagem  
Fonte: Alves & Moraes (1998)

#### 2.2.4 Obtenção do extrato enzimático bruto

Após 5 dias de cultivo as culturas foram submetidas à processo de ultrafiltração com auxílio de membrana Milipore®, constituída de acetato e nitrato de celulose com  $0,45\mu\text{m}$  de diâmetro, sendo a atividade enzimática determinada na fração líquida da cultura (Figura 4).

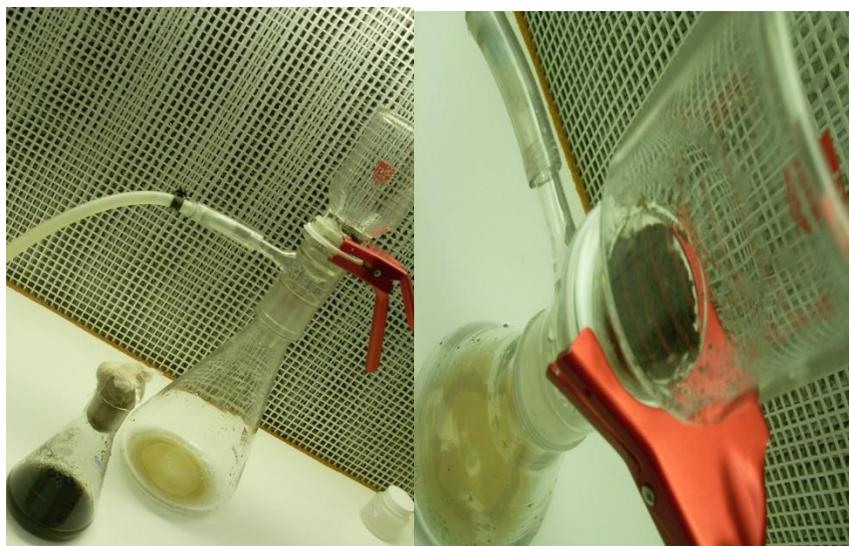


Figura 4 Processo de filtração para a obtenção do extrato enzimático bruto

## 2.2.5 Determinação da atividade de pectinases

### 2.2.5.1 Pectinametilesterase (PME)

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Schwan & Rose (1994). Uma solução de pectina cítrica a 1% foi preparada em NaCl 0,1M, ajustando-se o pH da solução para 7,5 com NaOH 0,5M. Três mL da solução de enzimas e 20 mL da solução de pectina cítrica foram adicionados em erlenmeyer de 50 mL, sendo a mistura incubada durante 30 minutos, mantendo o pH em 7,5 pela adição de NaOH 0,02M. A atividade de PME foi proporcional ao volume de NaOH gasto na titulação e foi expressa em microequivalentes de ácido pécico liberado por mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

### **2.2.5.2 Pectina liase (PL)**

A atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Kashyap et al., 2000. 1 mL da solução de enzimas foi adicionada a 5mL de solução de pectina 1%, sendo o volume ajustado para 10mL com água destilada. As amostras foram incubadas a 40°C por 2h, seguindo-se pela adição de 0,6mL de sulfato de zinco 9% e 0,6mL de hidróxido de sódio 0,5M. As amostras foram centrifugadas (3000rpm/10min) e 5 mL do sobrenadante foi adicionado a uma mistura de ácido tiobarbitúrico (3mL, 0,04M), HCl (2,5mL 0,1M) e água destilada (0,5mL). A mistura foi aquecida em banho-maria em ebulição por 30 minutos, resfriada à temperatura ambiente e a absorbância da solução foi medida a 550nm. Uma unidade de atividade foi dada como a quantidade de enzima que provocou uma alteração na absorbância de 0,01 na condição do ensaio. A atividade específica foi determinada dividindo-se a atividade enzimática encontrada pelo valor de proteínas totais na amostra.

### **2.2.5.3 Exo-poligalacturonase (Exo-PG)**

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Schwan & Rose (1994). Uma reta padrão de ácido poligalacturônico foi construída utilizando o método de Miller (DNS). 1,5 mL da solução de enzimas mais 1,0 mL de solução de sal sódico de ácido poligalacturônico a 0,1% em tampão citrato 0,1M pH 5,0 foram adicionados em tubo de ensaio. A mistura foi incubada em banho-maria a 40°C por 1 hora e após esse período a reação foi paralisada adicionando-se 1,5 mL de solução de ácido 3,5- dinitrossalicílico (DNS), sendo os tubos mantidos em banho fervente por 5 minutos e em seguida resfriados em banho de gelo. A absorbância da solução foi lida a 575nm. A atividade (U) de Exo-PG foi expressa na forma de  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de

ácido galacturônico liberados por mL por minuto nas condições do teste. A atividade enzimática específica foi determinada dividindo-se o valor de U/mL pelo valor de proteínas totais da mesma amostra, segundo metodologia de Bradford, sendo expressa na forma de  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de ácido galacturônico liberados por massa (mg ou  $\mu\text{g}$ ) de proteínas por minuto nas condições do teste.

#### 2.2.5.4 Endo-poligalacturonase (Endo-PG)

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Lima (2006). A mistura da reação conteve 5,5 mL de solução de pectina 0,2% em tampão acetato de sódio 0,025M pH 5,0 contendo 1mM de EDTA (ácido etileno di-amino tetraacético) e 250 $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. Após a homogeneização das misturas em agitador de tubo, estas foram incubadas em banho-maria a 50°C por 10 minutos e em seguida a reação foi interrompida colocando-se as amostras em banho de gelo. A leitura foi realizada em viscosímetro de Ostwald tamanho 200, medindo-se o tempo (t) de escoamento das amostras, do branco e da água deionizada, calculando-se a atividade segundo Mill & Tuttobello (1961); Teixeira (1994):

$$\% \text{ da redução de viscosidade} = \frac{t \text{ branco} - t \text{ amostra}}{t \text{ branco} - t \text{ água}} \times 100$$

$$\text{Unidade Viscosimétrica: UV/mL} = \left[ \frac{\% \text{ da redução de viscosidade}}{50} \right] \times 4$$

$$10$$

### 2.2.6 Determinação de proteínas totais na amostra (*Microanálise*)

A atividade enzimática específica das amostras foi determinada dividindo-se o valor da atividade enzimática encontrada (U/mL) pelo valor de proteínas totais (mg/mL) das amostras de acordo com a metodologia de Bradford. Para a quantificação de proteínas na amostra foram adicionados em tubo de ensaio 0,1 mL da amostra + 1 mL do reagente de Comassie Blue G-250 (reagente de Bradford). O branco foi preparado pela adição de 0,1 mL de água + 1 mL do reagente de Comassie-Blue G-250. Em seguida, estes foram homogeneizados em vórtex, e passados 5 minutos da agitação, a absorbância foi lida a 595 nm.

### 2.2.7 Determinação da atividade enzimática específica

Para obter maior confiabilidade nos resultados e eliminar proteínas indesejáveis, procedeu-se ao cálculo da atividade enzimática específica, a qual foi calculada dividindo-se o número de unidades de enzima (U) pelo número de proteínas totais na amostra (mg) conforme a fórmula abaixo. Os resultados foram expressos em U/g.

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de unidades de enzima (U)}}{\text{Miligramas de proteína (mg)}}$$

## 2.3 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi conduzido em um delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) com três repetições, num esquema fatorial triplo (4 x 4 x 3), constituindo de 4 isolados do fungo *Cladosporium cladosporioides*

(*Fres.*) *de Vries* (G080, G082, G084, G088), 4 substratos (casca de café, laranja, maracujá e uva) e 3 concentrações de pectina (0,1; 0,25 e 0,5%). A variável analisada foi a atividade enzimática específica, sendo os demais dados interpretados por meio de análise de variância (ANAVA) e as médias analisadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o software SISVAR®.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Composição centesimal, açúcar e pectina total dos substratos utilizados no meio de fermentação

Os resultados demonstraram que os substratos utilizados no meio de fermentação como fonte de carbono pelos isolados do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries apresentaram diferentes valores em sua composição nutricional, pectina total e também na % de açúcares totais, conforme pode ser observado nas Tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2 Valores médios de açúcares totais (g/100g), umidade e resíduo mineral fixo (%) em função dos substratos estudados

| Substratos        | Médias (erros-padrão) |                |                      |
|-------------------|-----------------------|----------------|----------------------|
|                   | Açúcar                | Umidade        | Resíduo Mineral Fixo |
| Casca de café     | 7,57 (0,4) c          | 11,23 (0,27) b | 7,11 (0,14) b        |
| Cascade laranja   | 23,28 (0,4) b         | 11,12 (0,27) b | 2,91 (0,14) c        |
| Casca de maracujá | 0,95 (0,4) d          | 8,06 (0,27) c  | 6,5 (0,14) b         |
| Casca de uva      | 43,92 (0,4) a         | 15,35 (0,27) a | 8,82 (0,14) a        |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey, ao nível de 5% de significância

Foi possível observar crescimento dos isolados do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries em todos os substratos, os quais puderam ser utilizados pelo microrganismo como fonte de carbono, entretanto para alguns foi observado menor crescimento como, por exemplo, a casca de café e casca de maracujá. Com relação à casca de café, o menor crescimento pode ser devido ao fato de que esta apresenta em sua composição compostos inibidores ao

desenvolvimento do fungo, tais como os compostos fenólicos. Já a casca de maracujá, por se tratar de um substrato rico em pectina (Tabela 4), pode ter resultado no fenômeno de repressão catabólica, ou seja, maiores concentrações do substrato inibiram o desenvolvimento do microrganismo.

A casca de uva, apesar da menor concentração de pectina resultou em bom crescimento dos isolados. Tal fato pode ser atribuído à presença de maior % de açúcares totais nesse substrato (Tabela 2), a qual foi utilizada pelo microrganismo como fonte de carbono. Costa (2007) também verificou que a quantidade de açúcar presente na casca de uva, influenciou positivamente a atividade de pectinases por um isolado do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. Entretanto, alguns autores revelam que altas quantidades de açúcares no substrato, suprem a necessidade dos microrganismos para o seu crescimento, fazendo com que a molécula de pectina seja pouco utilizada, resultando em menor atividade pectinolítica (Fawole & Odunfa, 2003).

Tabela 3 Valores médios de extrato etéreo, fibra bruta e fração protéica (%) em função dos substratos estudados

| Substratos        | Médias (erro-padrão) |                |                 |
|-------------------|----------------------|----------------|-----------------|
|                   | Extrato etéreo       | Fibra bruta    | Fração protéica |
| Casca de café     | 1,52 (0,12) b        | 24,92 (0,36) b | 11,48 (0,12) a  |
| Casca de laranja  | 1,57 (0,12) b        | 15,41 (0,36) c | 8,2 (0,12) b    |
| Casca de maracujá | 3,25 (0,12) a        | 27,07 (0,36) a | 11,53 (0,12) a  |
| Casca de uva      | 1,44 (0,12) b        | 16,67 (0,36) c | 5,69 (0,12) c   |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A casca de maracujá, assim como a casca de café apresentaram maiores quantidades de fibra bruta (Tabela 3), o que também pode ter dificultado o desenvolvimento dos isolados, assim como foi observado por Costa (2007). A casca de laranja apresentou maior quantidade de pectina total quando comparada com os demais substratos e concentrações balanceadas de açúcares totais, o que pode ter influenciado positivamente o crescimento dos isolados. Camargo et al., (2005) verificaram que o bagaço de laranja, mostrou ser um eficiente substrato para o desenvolvimento de *Aspergillus* sp. induzindo a síntese de pectinases. Para Souza et al., (2010), a pectina, além do efeito indutivo, favorece a excreção de pectinases pelos fungos produtores, sendo assim a utilização de substratos ricos em pectina é mais viável. Desta forma, seria interessante a busca de substratos ricos em pectina e açúcares totais a fim de alcançar um equilíbrio positivo no crescimento dos isolados e conseqüentemente na maior produção de pectinases.

Tabela 4 Valores médios de pectina total e solúvel (g/100g) e solubilidade da pectina (%) em função dos substratos estudados

| Substratos        | Médias (erro-padrão) |                 |                |
|-------------------|----------------------|-----------------|----------------|
|                   | Pectina Total        | Pectina Solúvel | Solubilidade   |
| Casca de café     | 6,26 (0,25) c        | 2,41 (0,35) b   | 41,56 (2,17) b |
| Casca de laranja  | 12,82 (0,25) a       | 2,17 (0,35) b   | 16,13 (2,17) c |
| Casca de maracujá | 10,7 (0,25) b        | 8,22 (0,35) a   | 88,74 (2,17) a |
| Casca de uva      | 4,18 (0,25) d        | 2,13 (0,35) b   | 50,29 (2,17) b |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade

### 3.2 Atividade pectinolítica produzida pelos isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries

#### 3.2.1 Atividade de pectinametilsterase (PME)

Os valores médios de atividade enzimática específica (U/g) de pectinametilsterase (PME) produzida por isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries utilizando como substratos diferentes resíduos agroindustriais avaliados em três concentrações são demonstrados na Tabela 5.

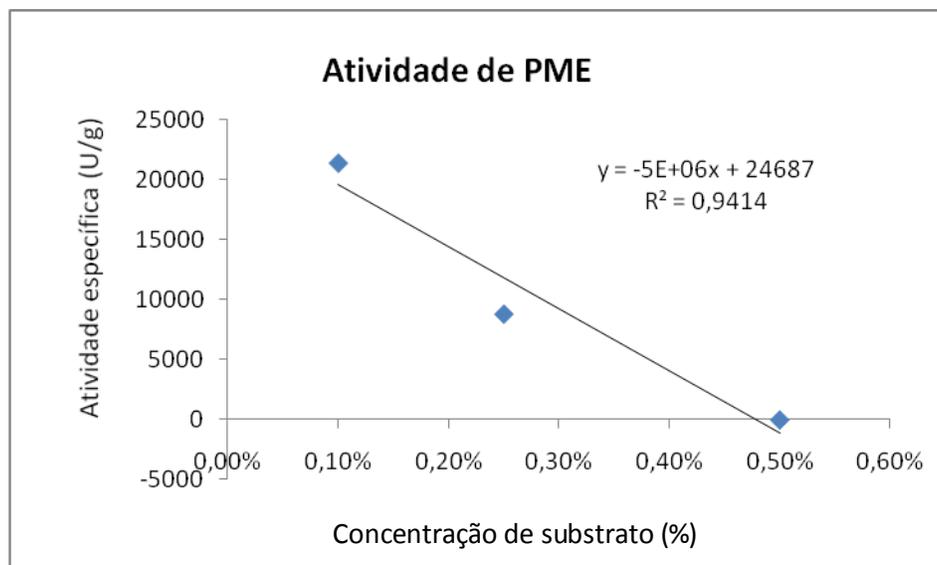
Tabela 5 Valores médios de atividade enzimática específica de pectinametilsterase (U/g) de isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries em função de quatro substratos avaliados em três concentrações

| Isolado     | Substrato     |           |          |                  |           |          |
|-------------|---------------|-----------|----------|------------------|-----------|----------|
|             | Casca de café |           |          | Casca de laranja |           |          |
|             | Concentrações |           |          |                  |           |          |
|             | 0,10%         | 0,25%     | 0,50%    | 0,10%            | 0,25%     | 0,50%    |
| <b>G080</b> | 1765 bA       | 0,000 bB  | 0,000 bB | 10540 cB         | 15130 bA  | 0,000 aC |
| <b>G082</b> | 1685 bA       | 0,000 bB  | 0,000 bB | 21385 bA         | 8813,33cB | 0,000 aC |
| <b>G084</b> | 0,000 cA      | 0,000 bA  | 0,000 bA | 10720 cB         | 25210 aA  | 0,000aC  |
| <b>G088</b> | 3240 aA       | 1203,33aB | 920 aB   | 28870 aA         | 0,000dB   | 0,000aB  |

| Isolado     | Substrato         |           |           |              |         |          |
|-------------|-------------------|-----------|-----------|--------------|---------|----------|
|             | Casca de maracujá |           |           | Casca de uva |         |          |
|             | Concentrações     |           |           |              |         |          |
|             | 0,10%             | 0,25%     | 0,50%     | 0,10%        | 0,25%   | 0,50%    |
| <b>G080</b> | 6590 aA           | 3140 aC   | 4340 bB   | 15170 bA     | 8755 aB | 7855 cC  |
| <b>G082</b> | 0,000 bB          | 3005 aA   | 3066,66cA | 27015 aA     | 7725 bC | 9155 bB  |
| <b>G084</b> | 0,000 bA          | 0,000 bA  | 0,000 dA  | 5020 dB      | 6850 bA | 0,000dC  |
| <b>G088</b> | 6160 aB           | 3576,66aC | 9345 aA   | 10062,5cB    | 4570 cC | 44895 aA |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade  
CV (%) = 6,57

Os resultados demonstraram que a casca de laranja não promoveu diferenças significativas na atividade da enzima pectinametilesterase (PME) utilizando a concentração de 0,5% em todos os isolados, resultando em atividade enzimática nula. Em trabalhos realizados por Menezes et al., (2006) acerca da produção de PME por uma linhagem de *Aspergillus niger* mutante utilizando casca de maracujá e farelo de trigo como substrato, verificou-se que a atividade desta enzima não ultrapassou 1,0 U/mL. Observou-se ainda um decréscimo significativo na atividade da enzima pelo isolado G082 à medida que a concentração do substrato casca de laranja utilizado como fonte de pectina foi aumentada (Gráfico 1), sugerindo a ocorrência de uma possível repressão catabólica, ou seja, maiores quantidades do substrato inibiram a atividade da enzima produzida pelo microrganismo, demonstrando que a utilização de menores concentrações desse substrato é mais viável. Esse mesmo tipo de comportamento foi observado com o isolado G080, tendo como substrato a casca de uva.



**Gráfico 1** Atividade enzimática específica de pectinametilsterase (U/g) em função do substrato casca de laranja (%), tendo como agente de fermentação o isolado G082

O isolado G084 também resultou em atividade enzimática nula utilizando como substrato a casca de café e a casca de maracujá em ambas as concentrações avaliadas. Martin et al., (2005) avaliando a produção de pectinases por *Moniella* sp. e *Penicillium* sp. verificaram que as duas linhagens não produziram quantidades detectáveis de pectinaesterase durante todo o período fermentativo.

O isolado G088 promoveu maior atividade da enzima PME (44895 U/g), utilizando a casca de uva na concentração de 0,5%, demonstrando que este isolado foi o melhor produtor de pectinametilsterase (PME) e a casca de uva o melhor substrato indutor da síntese dessa enzima. Costa (2007) também verificou que a casca de uva foi o melhor substrato para a produção de PME por este mesmo isolado, alcançando valores de 1760 U/g aos 14 dias de cultivo utilizando fermentação em estado sólido. Meneses (2007) também constatou maior índice de produção da enzima PME pelo isolado G088, utilizando

fermentação em estado sólido, com atividade máxima de 1633,33 nmol/g.min aos 29 dias de cultivo.

Entretanto, é importante considerar que o tipo de fermentação utilizada no presente trabalho foi a fermentação submersa, ao contrário do que se foi avaliado em estudos anteriores, nos quais foi utilizada a fermentação em estado sólido. Para Menezes et al., (2006), a comparação de dados entre diferentes processos deve ser feita levando-se em consideração uma série de fatores tais como o substrato, espécie microbiana utilizada, umidade, aeração e metodologia de quantificação. Segundo Rocha (2010), generalizar vantagens em relação a esses dois processos não é tarefa fácil, uma vez que o microrganismo pode se adaptar melhor a um ou a outro tipo de fermentação.

### **3.2.2 Atividade de pectina liase (PL)**

As médias da atividade enzimática específica de pectina liase (PL) produzida pelos isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries utilizando diferentes concentrações de substrato são representadas na Tabela 6.

Tabela 6 Valores médios de atividade enzimática específica de pectina liase (U/g) de isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries em função de quatro substratos avaliados em três concentrações

| Isolado | Substrato     |             |             |                  |            |             |
|---------|---------------|-------------|-------------|------------------|------------|-------------|
|         | Casca de café |             |             | Casca de laranja |            |             |
|         | Concentrações |             |             |                  |            |             |
|         | 0,10%         | 0,25%       | 0,50%       | 0,10%            | 0,25%      | 0,50%       |
| G080    | 49143,33cA    | 47973,33bA  | 62060 bA    | 17915 cC         | 40473,33bB | 235415 aA   |
| G082    | 96523,33aB    | 102523,33aB | 120123,33aA | 141533,33bA      | 86816,66aB | 125503,33bA |
| G084    | 68853,33bB    | 66070 bB    | 110673,33aA | 22883,33cB       | 40720 bA   | 17320 dB    |
| G088    | 65276,66bcB   | 24193,33cC  | 101545aA    | 203220 aA        | 13020 cC   | 58843,33cB  |

| Isolado | Substrato         |             |             |              |             |            |
|---------|-------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|------------|
|         | Casca de maracujá |             |             | Casca de uva |             |            |
|         | Concentrações     |             |             |              |             |            |
|         | 0,10%             | 0,25%       | 0,50%       | 0,10%        | 0,25%       | 0,50%      |
| G080    | 68866,66aB        | 13486,66cC  | 126430 bA   | 77056 bC     | 173110 aB   | 274260 aA  |
| G082    | 66473,33aC        | 117136,66aA | 88686,66cB  | 19970 cC     | 100716,66bA | 53836,66cB |
| G084    | 60083,33aB        | 23606,66cC  | 223616,66aA | 99226,66aC   | 165646,66aB | 271570 aA  |
| G088    | 61306,66aB        | 86996,66bA  | 97673,33cA  | 82005 abB    | 40195 cC    | 126755 bA  |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

CV (%) = 9,77

Os resultados demonstraram os isolados do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries como bons produtores da enzima pectina liase (PL). Os isolados G080 e G084 promoveram maior atividade enzimática (274260 e 271570 U/g, respectivamente), ambos utilizando como substrato a casca de uva na concentração 0,5%. Martin et al., (2005) estudando a influência do tempo de cultivo na produção de pectinases, alcançaram valores de 9080 e 4870 U/g de pectina liase (PL) pelas linhagens *Moniella* e *Penicillium* sp., respectivamente, valores estes inferiores ao encontrado no presente trabalho, demonstrando grande potencial do *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de

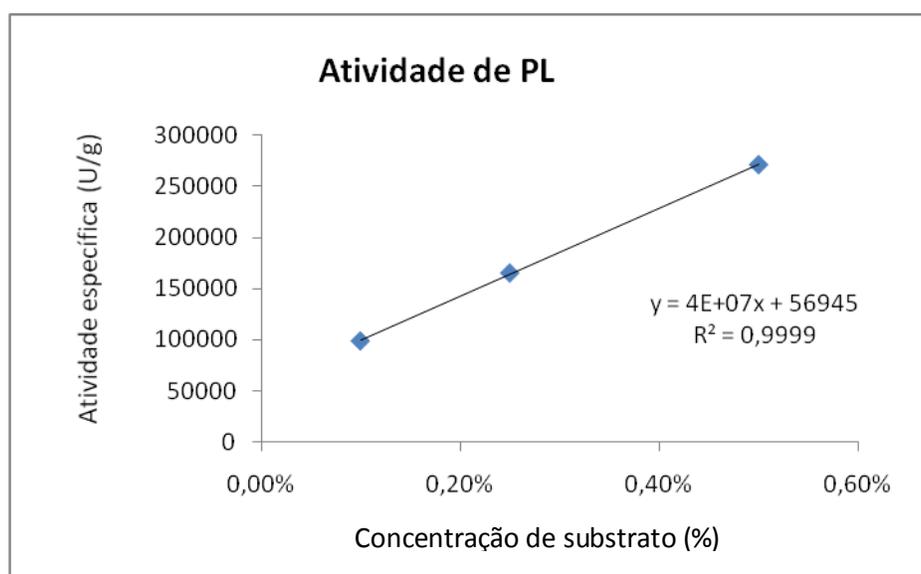
*Vries* na síntese da enzima pectina liase e a casca de uva como um eficiente substrato indutor.

O isolado G084 resultou em alta atividade da enzima PL (223616,66 U/g) utilizando como substrato a casca de maracujá na concentração 0,5%. Os isolados G080 e G088 também promoveram atividades relevantes de pectina liase (PL), utilizando como substrato a casca de laranja nas concentrações de 0,5 e 0,1%, respectivamente, com atividade enzimática específica de 235415 e 203220 U/g, demonstrando que a casca de laranja é também um bom substrato indutor da síntese da enzima pectina liase. Silva et al., (2002) avaliando a produção de pectinases por *Penicillium viridicatum* verificaram que a atividade máxima da enzima pectina liase (2000 U/g<sup>-1</sup>) foi obtida em meio sólido contendo bagaço de laranja, quando avaliado isoladamente. Entretanto, uma mistura de bagaço de laranja e farelo de trigo elevou a atividade de PL para 3540 U/g<sup>-1</sup>.

As diferentes concentrações avaliadas não resultaram em diferenças significativas, quando se utilizou como substrato a casca de café, tendo como agente de fermentação o isolado G080, ao contrário do que se foi observado com os substratos casca de laranja e casca de uva, onde as diferentes concentrações de pectina avaliadas resultaram em efeitos significativos na atividade da enzima PL pelo isolado G080, observando-se ainda um aumento considerável na atividade à medida que a concentração do substrato foi elevada, sugerindo que maiores concentrações da fonte indutora podem resultar em maior atividade enzimática. Este mesmo comportamento foi observado com o isolado G084, utilizando como substrato a casca de uva (**Gráfico 2**).

Observa-se a partir dos resultados que tanto o isolado como o substrato exercem uma influência direta sobre a atividade da enzima, demonstrando que ambos resultaram em atividades consideráveis da enzima pectina liase (PL), entretanto a casca de uva quando utilizada em maiores concentrações

demonstrou ser o melhor substrato para a síntese dessa enzima, tendo como agentes de fermentação os isolados G080 e G084.



**Gráfico 2** Atividade enzimática específica da enzima pectinaliase (U/g) em função do substrato casca de uva (%), tendo como agente de fermentação o isolado G084

### 3.2.3 Atividade de exo-poligalacturonase (exo-PG)

Os valores médios de atividade enzimática específica (U/g) de exo-poligalacturonase produzida por isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries utilizando quatro substratos avaliados em três diferentes concentrações são demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7 Valores médios de atividade enzimática específica de exopoligalacturonase (U/g) de isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries em função de quatro substratos avaliados em três concentrações

| Isolado | Substrato     |        |          |                  |       |            |
|---------|---------------|--------|----------|------------------|-------|------------|
|         | Casca de café |        |          | Casca de laranja |       |            |
|         | 0,10%         | 0,25%  | 0,50%    | 0,10%            | 0,25% | 0,50%      |
| G080    | 10 aB         | 30 aB  | 70 aA    | 10 bC            | 60 aB | 173,33 aA  |
| G082    | 0,000 bB      | 10 aAB | 63,33 aA | 50 aA            | 70 aA | 10 cB      |
| G084    | 0,000 bB      | 30 aAB | 73,33 aA | 10 bB            | 30 bB | 123,33 abA |
| G088    | 10 aA         | 20 aA  | 36,66 bA | 70 aAB           | 20 bB | 83,33 bA   |

| Isolado | Substrato         |          |           |              |           |           |
|---------|-------------------|----------|-----------|--------------|-----------|-----------|
|         | Casca de maracujá |          |           | Casca de uva |           |           |
|         | 0,10%             | 0,25%    | 0,50%     | 0,10%        | 0,25%     | 0,50%     |
| G080    | 20 aB             | 20 aB    | 106,66 bA | 50 bC        | 173,33 cB | 2023,33bA |
| G082    | 13,33aAB          | 0,000 bB | 63,33 bA  | 393,33 aC    | 530 aB    | 670 cA    |
| G084    | 20 aB             | 26,66 aB | 176,66 aA | 63,33 bC     | 330 bB    | 2150 aA   |
| G088    | 20 aB             | 20 aB    | 236,66 aA | 20 cC        | 186,66 cB | 290 dA    |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade  
CV (%) = 17,91

Os resultados demonstraram que, em todos os isolados, foi possível verificar atividade da enzima exo-poligalacturonase (exo-PG). O isolado G084 resultou em maior atividade enzimática (2150 U/g) seguido pelo isolado G080 (2023 U/g) ambos utilizando como substrato a casca de uva na concentração de 0,5%, demonstrando que este substrato quando utilizado em maiores concentrações é mais viável para a síntese da enzima exo-poligalacturonase pelos isolados G080 e G084. Martin et al., (2005) estudando o tempo de cultivo na produção de pectinases encontrou produção máxima de exo-PG de 84,8 U/g

pela linhagem fúngica *Moniella* sp. e um máximo de 13 U/g pela linhagem *Penicillium* sp. ambos utilizando uma mistura de bagaço de laranja, bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo em fermentação semi-sólida. Tais valores podem ser considerados inferiores aos obtidos no presente trabalho, entretanto, para se comparar tais valores é importante considerar o tipo de substrato, o meio de fermentação e o tipo de microrganismo em estudo.

A casca de café não promoveu diferenças significativas na atividade da enzima exo-PG em todos os isolados utilizando as concentrações 0,25 e 0,5%, assim como foi observado para os substratos casca de laranja e maracujá, nas concentrações 0,25 e 0,1%, respectivamente. Já com relação à casca de uva, ambas as concentrações avaliadas resultaram em diferenças significativas na atividade da enzima em todos os isolados, observando-se ainda um aumento significativo na atividade, à medida que a concentração foi elevada, sugerindo que maiores concentrações do substrato podem resultar em maior atividade enzimática. Cordeiro & Martins (2009) em estudos acerca da produção de poligalacturonase pelo termofílico *Bacillus* sp. verificaram que o aumento da concentração de pectina no meio de cultura, acima de 0,5% não proporcionou um aumento na atividade da enzima. Com base nos resultados, o isolado G084 demonstrou ser o melhor produtor da enzima exo-poligalacturonase (exo-PG) utilizando como substrato a casca de uva na concentração 0,5%.

#### **3.2.4 Atividade de endo-poligalacturonase (endo-PG)**

Os valores médios de atividade enzimática específica (U/g) de endo-poligalacturonase (endo-PG) de isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, utilizando quatro substratos avaliados em três concentrações, são demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8 Valores médios de atividade enzimática específica de endo-poligalacturonase (U/g) de isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries em função de quatro substratos avaliados em três concentrações

| Isolado | Substrato     |           |           |                  |            |           |
|---------|---------------|-----------|-----------|------------------|------------|-----------|
|         | Casca de café |           |           | Casca de laranja |            |           |
|         | 0,10%         | 0,25%     | 0,50%     | 0,10%            | 0,25%      | 0,50%     |
| G080    | 292,55 aA     | 23,975 bB | 180,6 aA  | 623,96 cC        | 5516,05 bA | 2446,43bB |
| G082    | 258,66 aA     | 287,83 aA | 116,45 aA | 5459,05bA        | 2412,33cB  | 826,43 dC |
| G084    | 407,96 aA     | 86,65 aB  | 141,15 aB | 614 cC           | 5959,4 aA  | 1237,05cB |
| G088    | 328,2 aA      | 162,76 aA | 130,1 aA  | 6074,33aA        | 779,8 dC   | 3138,03aB |

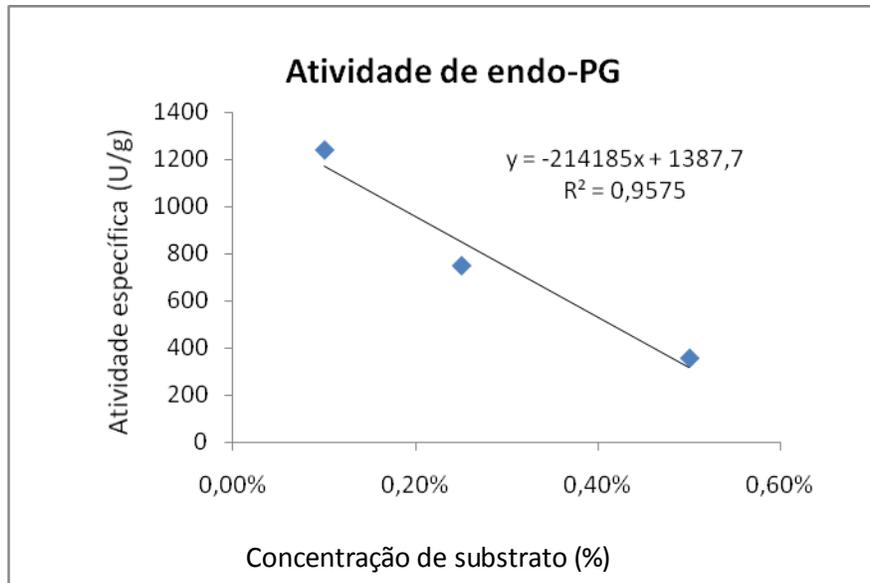
| Isolado | Substrato         |           |           |              |           |           |
|---------|-------------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|
|         | Casca de maracujá |           |           | Casca de uva |           |           |
|         | 0,10%             | 0,25%     | 0,50%     | 0,10%        | 0,25%     | 0,50%     |
| G080    | 1470,15aA         | 656,85 aB | 757,9 bB  | 831,250cA    | 805,5 aA  | 972,06 cA |
| G082    | 1187,5 aA         | 605,25 aB | 973,95 bA | 1238,63bA    | 748,1 abB | 355,85 dC |
| G084    | 716,65 bB         | 929,7 aB  | 3425,66aA | 1930,76aA    | 1090,45aB | 1979,65aA |
| G088    | 1279,23 aB        | 704,7 aC  | 3105,43aA | 1253,43bA    | 396,1 bB  | 1345,53bA |

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade  
CV (%) = 12,46

Os resultados demonstraram que todos os isolados foram capazes de produzir a enzima endo-poligalacturonase (endo-PG). O isolado G088 resultou em maior atividade (6074, 33 U/g), tendo como substrato a casca de laranja na concentração 0,1%, seguido pelo isolado G084 (5959,4 U/g) utilizando a concentração 0,25%, demonstrando que a casca de laranja é uma fonte promissora para a síntese da enzima endo-PG. Panarotto et al., (2006) avaliando a produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger*, alcançaram uma atividade máxima de endo-PG de 47,1 U/g, utilizando cascas de limão Taiti

como substrato sólido. Salvador et al., (2004) avaliando o efeito de diferentes concentrações de glicose sobre a produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em meio sólido alcançaram atividade máxima de endo-PG de 165 U/g em 72 horas de cultivo em meio contendo 10% de glicose. Martins et al., (2005) em estudos sobre o perfil enzimático produzido pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* verificaram que a produção máxima de endo-poligalacturonase em fermentação em estado sólido foi de 3,6 U/g.

A casca de café não produziu efeitos significativos na atividade da enzima endo-PG em todos os isolados, utilizando as concentrações de 0,1 e 0,5%, assim como também pôde se observado com a casca de maracujá na concentração 0,25%. Não foram observadas ainda diferenças significativas na atividade da enzima quanto às concentrações avaliadas, tendo como agente de fermentação o isolado G080 e a casca de uva como substrato, ao contrário do que ocorreu com o isolado G082, no qual esse mesmo substrato resultou em diferenças significativas na atividade da enzima, observando-se ainda um decréscimo na atividade à medida que a concentração foi aumentada (**Gráfico 3**). Esse mesmo comportamento foi observado quando se utilizou a casca de laranja, sugerindo que maiores concentrações de substrato inibem a atividade da enzima endo-PG pelo isolado G082. Observou-se a partir dos resultados que a casca de laranja na concentração 0,1% foi o melhor substrato indutor da síntese da enzima endo-poligalacturonase (endo-PG), tendo como agente de fermentação o isolado G088.



**Gráfico 3** Atividade enzimática específica da enzima endo-poligalacturonase (U/g) em função do substrato casca de uva (%), tendo como agente de fermentação o isolado G082

## 4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados experimentais, pode-se concluir que:

- a) os isolados foram capazes de se desenvolver em todos os substratos avaliados, com destaque para casca de laranja e casca de uva;
- b) a composição dos substratos exerceu influência sobre a atividade das pectinases;
- c) a casca de café demonstrou ser uma fonte menos promissora para a síntese de pectinases quando comparada com os demais substratos;
- d) o isolado G088 apresentou índices médios superiores para a produção da enzima pectinametilesterase (PME), utilizando como substrato a casca de uva numa concentração de 0,50% ;
- e) os isolados G080 e G084 apresentaram índices superiores para a produção da enzima pectina liase (PL), utilizando como substrato a casca de uva na concentração 0,50% ;
- f) o isolado G084 apresentou índices médios superiores para a produção da enzima exo-poligalacturonase, utilizando como substrato a casca de uva na concentração 0,50% ;
- g) o isolado G088 apresentou índices médios superiores para a produção da enzima endo-poligalacturonase (endo-PG) utilizando como substrato a casca de laranja na concentração 0,1% ;
- h) a casca de uva demonstrou ser o melhor substrato indutor da síntese das enzimas pectinametilesterase (PME), pectina liase (PL) e exo-poligalacturonase (exo-PG);
- i) a casca de laranja mostrou ser o melhor substrato para a síntese da enzima endo-poligalacturonase (endo-PG);

- j) a utilização da fermentação submersa mostrou-se viável na produção de pectinases pelo fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries;
- k) a utilização de resíduos agroindustriais nesse processo é uma alternativa para o aproveitamento e minimização dos mesmos;
- l) existe grande diferença entre os isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries quanto à produção de pectinases, sugerindo uma diferença genética entre os mesmos e indicando a possibilidade de obtenção de um super produtor destas enzimas através de modificações genéticas.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As avaliações dos isolados quanto à produção de enzimas, não só as pectinases devem continuar, a fim de se estabelecer parâmetros ideais de tempo, temperatura, combinação de substratos, condições de cultivo, dentre outros fatores que visem a otimização do processo para posterior purificação e utilização dessas enzimas na indústria de alimentos. É importante considerar ainda, estudos que viabilizem a utilização da fermentação submersa, já que esse processo é geralmente utilizado em grande escala.

## REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 15 ed. Washington, 1990. 1117 p.
- ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 765-777.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BITTER, T.; MUIR, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 4, n° 4, p. 330-334, 1962.
- CAMARGO, L. A.; DENTILLO, D. B.; CARDELLO, L. *et al.* Utilização de bagaço de laranja na produção de pectinase de *Aspergillus* sp. **Alim. Nutr.**, Araraquara v. 16, n° 2, p. 153-156, abr./jun. 2005.
- CARVALHO, S. **Pectinases produzidas pelo agente biológico “G088”: extração e purificação**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) \_ Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- CORDEIRO, C. A. M; MARTINS, M. L. L. Production of a polygalacturonase, by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzyme. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** vol.29, n°1, Campinas Jan./Mar. 2009.
- COSTA, L. M. A. S. **Utilização de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de enzimas pectinolíticas pelo agente biológico “GO88”**. 2007. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) \_ Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- DISCHE, Z. General colors reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic Press, 1962. P. 477-512.
- FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodegradation & Biodegradation**, v.52, p.223-227, 2003.

FONTANA, R. C. **Estudo da produção de poligalacturonases em processo submerso em biorreatores de agitação mecânica e airlift.** Tese (Doutorado) \_ Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-graduação em biotecnologia, 2009.

FERNÁNDEZ, D. E. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial.** 125p (Tese Pós-graduação em Processos Biotecnológicos), Curitiba, 2009.

KASHYAP, D. R.; CHANDRA, S.; KAUL, A. *et al.* Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 16: 277-282, 2000.

LIMA, A. R. de S. **Produção de pectinases por *Aspergillus* e clarificação de suco de camu-camu com poligalacturonases e pectinaes terases** (Dissertação) \_ Universidade Federal do Amazonas, 85p., Manaus, 2006.

MARTIN, N.; SILVA, R. da; GOMES, E. **Estudo do tempo de cultivo na produção de pectinases por *Penicillium* sp EGC5 e *Moniella* sp 9SB em fermentação semi-Sólida (FSS) de resíduos agrícolas.** Universidade Estadual Paulista \_ UNESP, São José do Rio Preto – SP, 2005.

MENESES, A. G. **Produção de enzimas pectinolíticas e seletividade de produtos fitossanitários sobre o agente biológico “G088”.** 2007. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) \_ Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MENEZES, G. D, G. de; OLIVEIRA, A. C. P. de; DAMASO, M. C. T. *et al.* Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. **Rev. Univ. Rural**, Série Ciências Exatas e da Terra. Seropédica, RJ, EDUR, v. 25, nº 1, p. 15-27, 2006.

MILL, P. J.; TUTTOBELLO, R. The pectic enzymes of *Aspergillus niger* 2. endopolygalacturonase. **Biochemistry Journal**, Columbus, v. 79, p. 57 – 64, 1961.

MONTEIRO, A. C. **Produção de poligalacturonases por fungos termofílicos e mesofílicos em fermentação em estado sólido e comparação das isoformas das enzimas produzidas por cada grupo** (Dissertação), 80p. Universidade Estadual Paulista \_ UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro-SP, 2008.

OLIVEIRA, A. N. de; OLIVEIRA, L. A. de; ANDRADE, J. S. *et al.* Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 2006, vol.26, nº4, p. 853-860.

PANAROTTO, C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. **Avaliação das casca de limão Taiti como fonte de indutor na produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em estado sólido.** Universidade de Caxias do Sul \_ Instituto de Biotecnologia, Caxias do Sul – RS, 2006.

RIVAS, B.; MOLDES, A. B.; DOMINGUEZ, J. M. *et al.* Development of culture media containing spent yeasts cells of *Dearyomyces hansenii* and steep licor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **Internacional Journal of Food Microbiology**, 97: p. 93-98, 2004.

ROCHA, C. P. **Otimização da produção de enzimas por *Aspergillus niger* em fermentação em estado sólido.** (Dissertação de Mestrado). 136p. Universidade Federal de Uberlândia \_ Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, 2010.

SALVADOR, S.; SILVEIRA, M. M. da; FONTANA, R. C. Avaliação de diferentes concentrações de glicose sobre a produção de poligalacturonases por *Aspergillus niger* em meio sólido. Laboratório de Processos Biotecnológico/INBI/UCS, 2004.

SANTI, L. **Produção, caracterização e aplicação de preparados pectinolíticos produzidos por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais.** (Dissertação de Mestrado). 90p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2005.

SANTOS, S. F. de M.; MACEDO, G. R. de; SILVA, F. L. H. da; *et al.* Aplicação da metodologia da superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. **Quim. Nova**, vol. 31, nº8, p.1973-1978, 2008.

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

SOUZA, R. L. A. de, OLIVEIRA, L. de S. C., SILVA, F. L. H. da; *et al.* Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, vol. 14, nº 9, Campina Grande, set./2010.

TAVARES, V. B.; SIVIERI, K.; CERON, C. A. *et al.* Utilização do resíduo líquido de indústria de processamento de suco de laranja como meio de cultura de *Penicillium citrinum*: depuração biológica do resíduo e produção de enzima. **Quím. Nova**, 1998, vol.21, nº6, p. 722-725.

TEIXEIRA, M. F. S. **Obtenção de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* termofílicos e termotolerantes na Amazônia e caracterização de suas enzimas de interesse na indústria de alimentos.** 1994. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas.

**APÊNDICE A Análise de variância (Anava) da atividade enzimática específica de pectinases produzidas por isolados de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries**

Tabela 1A ANAVA – Atividade enzimática específica de pectinametilestrase (PME)

| <b>FV</b>               | <b>GL</b> | <b>SQ</b>   | <b>QM</b>  | <b>Fc</b> | <b>Pr &gt; Fc</b> |
|-------------------------|-----------|-------------|------------|-----------|-------------------|
| Isolado                 | 3         | 539881538   | 179960512  | 963.229   | 0.0000            |
| Tratamento              | 3         | 3.2196135   | 1.07320452 | 5744.268  | 0.0000            |
| Concentração de pectina | 2         | 525762378   | 262881189  | 1407.057  | 0.0000            |
| Isolado*                | 9         | 958440000   | 106493333  | 570.000   | 0.0000            |
| Tratamento              |           |             |            |           |                   |
| Isolado*                | 6         | 1.56787746  | 261312911  | 1398.663  | 0.0000            |
| Concentração de pectina |           |             |            |           |                   |
| Tratamento*             | 6         | 2.026454560 | 337742426  | 1807.748  | 0.0000            |
| Concentração de pectina |           |             |            |           |                   |
| Isolado*                | 18        | 3.40350092  | 189083384  | 1012.058  | 0.0000            |
| Tratamento*             |           |             |            |           |                   |
| Concentração de pectina |           |             |            |           |                   |
| Erro                    | 96        | 17935729    | 186830     |           |                   |
| Total corrigido         | 143       | 1.225946616 |            |           |                   |

CV (%) = 6,57

Média geral: 6578.6979167

Número de observações: 14

Tabela 2A ANOVA – Atividade enzimática específica de pectina liase (PL)

| <b>FV</b>                  | <b>GL</b> | <b>SQ</b>   | <b>QM</b>    | <b>Fc</b> | <b>Pr &gt; Fc</b> |
|----------------------------|-----------|-------------|--------------|-----------|-------------------|
| Isolado                    | 3         | 7.930884653 | 2.64362822   | 32.419    | 0.0000            |
| Tratamento                 | 3         | 4.879988512 | 1.62666284   | 199.478   | 0.0000            |
| Concentração<br>de pectina | 2         | 1.067574674 | 5.33787337   | 654.586   | 0.0000            |
| Isolado*                   | 9         | 1.583182780 | 1.75909198   | 215.718   | 0.0000            |
| Tratamento                 |           |             |              |           |                   |
| Isolado*                   | 6         | 9.014015656 | 1.50233594   | 184.232   | 0.0000            |
| Concentração<br>de pectina |           |             |              |           |                   |
| Tratamento*                | 6         | 4.729595551 | 7.88265925   | 96.665    | 0.0000            |
| Concentração<br>de pectina |           |             |              |           |                   |
| Isolado*                   | 18        | 1.383631168 | 7.68683982   | 94.264    | 0.0000            |
| Tratamento*                |           |             |              |           |                   |
| Concentração<br>de pectina |           |             |              |           |                   |
| Erro                       | 96        | 7.828401900 | 81545853.125 |           |                   |
| Total corrigido            | 143       | 6.054341460 |              |           |                   |

CV (%) = 9,77

Média geral: 92444.305556

Número de observações: 144

Tabela 3A ANAVA – Atividade enzimática específica de exopoligalacturonase (exo-PG)

| <b>FV</b>                  | <b>GL</b> | <b>SQ</b>    | <b>QM</b>   | <b>Fc</b> | <b>Pr &gt; Fc</b> |
|----------------------------|-----------|--------------|-------------|-----------|-------------------|
| Isolado                    | 3         | 625933.333   | 208644.444  | 199.633   | 0.0000            |
| Tratamento                 | 3         | 7427194.444  | 2475731.481 | 2368.806  | 0.0000            |
| Concentração<br>de pectina | 2         | 3428676.388  | 1714338.194 | 1640.297  | 0.0000            |
| Isolado*                   | 9         | 1873116.666  | 208124.074  | 199.135   | 0.0000            |
| Tratamento                 |           |              |             |           |                   |
| Isolado*                   | 6         | 1747495.833  | 291249.305  | 278.670   | 0.0000            |
| Concentração<br>de pectina |           |              |             |           |                   |
| Tratamento*                | 6         | 6003784.722  | 1000630.787 | 957.414   | 0.0000            |
| Concentração<br>de pectina |           |              |             |           |                   |
| Isolado*                   | 18        | 4376420.833  | 243134.490  | 232.634   | 0.0000            |
| Tratamento*                |           |              |             |           |                   |
| Concentração<br>de pectina |           |              |             |           |                   |
| Erro                       | 96        | 100333.333   | 1045.138    |           |                   |
| Total corrigido            | 143       | 25582955.555 |             |           |                   |

CV (%) = 17,91

Média geral: 180.555

Número de observações: 144

Tabela 4A ANAVA – Atividade enzimática específica de endopoligalacturonase (endo-PG)

| <b>FV</b>                  | <b>GL</b> | <b>SQ</b>     | <b>QM</b>    | <b>Fc</b> | <b>Pr &gt; Fc</b> |
|----------------------------|-----------|---------------|--------------|-----------|-------------------|
| Isolado                    | 3         | 4176642.405   | 1392214.135  | 47.080    | 0.0000            |
| Tratamento                 | 3         | 139220424.245 | 46406808.081 | 1569.328  | 0.0000            |
| Concentração<br>de pectina | 2         | 992370.812    | 496185.406   | 16.779    | 0.0000            |
| Isolado*                   | 9         | 7748897.181   | 860988.575   | 26.116    | 0.0000            |
| Tratamento                 |           |               |              |           |                   |
| Isolado*                   | 6         | 46221567.012  | 7703594.502  | 260.511   | 0.0000            |
| Concentração<br>de pectina |           |               |              |           |                   |
| Tratamento*                | 6         | 32243316      | 5373886      | 181.727   | 0.0000            |
| Concentração<br>de pectina |           |               |              |           |                   |
| Isolado*                   | 18        | 113468176.718 | 6303787.595  | 213.174   | 0.0000            |
| Tratamento*                |           |               |              |           |                   |
| Concentração<br>de pectina |           |               |              |           |                   |
| Erro                       | 96        | 2838828.481   | 29571.130    |           |                   |
| Total corrigido            | 143       | 346910222.857 |              |           |                   |

CV (%) = 12,46

Média geral: 1380.502

Número de observações: 144