



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS
PECTINOLÍTICAS ISOLADAS DE FRUTAS
TROPICAIS**

EVÂNIA GERALDA DA SILVA

2003

EVÂNIA GERALDA DA SILVA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTINOLÍTICAS ISOLADAS DE
FRUTAS TROPICAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

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

Silva, Evânia Geralda da

Seleção de leveduras pectinolíticas isoladas de frutas tropicais / Evânia
Geralda da Silva. -- Lavras : UFLA, 2003.

79 p. : il.

Orientadora: Rosane Freitas Schwan.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia

1. Levedura. 2. Poligalacturonase. 3. Pectinases. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD-664.68

EVÂNIA GERALDA DA SILVA

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS PECTINOLÍTICAS ISOLADAS DE
FRUTAS TROPICAIS**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 18 de junho de 2003

Profa. Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada

UEM

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

UFLA



Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

**"As coisas são semelhantes: isto faz a ciência possível;
as coisas são diferentes: isto faz a ciência necessária."**

Levins e Lewontin, 1985

*A Cláudia Labory, pela sua amizade, carinho,
atenção e disposição sempre
muito agradeço.*

*A minha mãe, Maria, que no seu silêncio
muito me ensinou.*

*A minha avó Rachel, in memoriam, minha
segunda mãe.*

*Aos meus irmãos Tânia, Anália, Nilson e
Marco*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Prof.a Rosane Schwan por ter confiado a mim a realização desse trabalho, obrigada.

Ao Prof. Eustáquio Dias pelas dúvidas.

Ao Prof. Romildo pela convivência.

Ao Prof. João Cândido de Souza pela acolhida e convivência.

Ao Prof. Daniel Melo de Castro pela amizade.

Ao Prof. Júlio Louzada pelas sugestões.

Ao Prof. Mário Guerreiro (Química) pela prestatividade e auxílio.

À Profa Roberta Hilsdorf pela grande ajuda com as enzimas.

À Epamig pela concessão de equipamento.

A Adirana, da Microbiologia do Solo, pela ajuda incansável.

Cláudia Lobory, como agradecer pela lição de vida? Que Deus lhe abençoe.

Tânia, minha querida irmã, obrigada pelas orações, mesmo longe você está muito perto.

Carmem Wobeto, como agradecer pelo amparo?

Cristina Ferreira, obrigada pela "força".

Aos preciosos amigos que aqui encontrei e que caminharam junto comigo em mais esta etapa, Cláudia Labory, Cristina, Carmem Wobeto, Cidinha, Marisa,

Luana, Márcia, Aramália e Pascoal. Obrigada muito aprendi com vocês!

Aos colegas Claudinelli, Sílvia, Scheila, Raquel, Alexandre, Éderson, Ivany,

Miriam, Fernanda, Cláudia Eugênia, Luís e Cristina (estagiária). Valeu pela convivência!

Pelo sustento físico, agradeço a Irondina e Rosangela.

A Magda pela sua prestatividade e eficiência.

Aos amigos da Fisiologia, Claudinha, Aurélio, Rayres, Bel, Sílvia e Carol, pelos momentos agradáveis.

À família Louzada Júlio, Luísa, Marina e Jú pelas alegrias e amizade.

Ao Newton, Tânia, Iise e Orlando por terem feito parte de minha vida.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Pectina.....	3
2.2 Enzimas pécticas.....	5
2.2.1 Classificação.....	5
A Desmetoxilante.....	5
A1 Pectina metil esterase (PE).....	5
B Despolimerizantes.....	6
B1 Poligalacturonase.....	6
B2 Pectina liase (PL).....	6
B3 Pectato liase (PGL).....	7
B4 Protopectinase.....	7
2.3 Produção de pectinases por microrganismos.....	8
2.4 Aplicação das pectinases.....	13
2.4.1 Processamento de sucos de frutas.....	13
2.4.2 Indústria têxtil.....	15
2.4.3 Produção de vinho.....	16
2.4.4 Extração de óleo.....	16
2.4.5 Fermentação de chá, café e cacau.....	17
2.5 Pectinases comerciais.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Microrganismos: fonte e manutenção.....	20
3.2 Seleção de leveduras para atividade de poligalacturonase.....	20
3.3 Identificação das leveduras produtoras de pectinases.....	21
3.4 Seleção de leveduras para a atividade de pectina liase (PL).....	21
3.5 Determinação do número de células para a produção de enzimas em meio líquido.....	22
3.6 Produção de enzima.....	22
3.7 Ensaio enzimático.....	23
3.7.1 Poligalacturonase (PG).....	23
3.7.2 Determinação de proteína total.....	23
3.7.3 Pectina liase (PL).....	24
3.7.4 Determinação de protease.....	25
3.7.5 Determinação de poligalacturonase com variação de tempo, temperatura e pH do substrato.....	25
3.8 Purificação (Diálise).....	25
3.9 Determinação da massa molecular (SDS PAGE).....	26

3.10 Determinação da atividade de endo-poligalacturonase.....	27
3.11 Determinação de pectina metil esterase (PE).....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Seleção de leveduras para a atividade de poligalacturonase e pectina liase.....	28
4.2 Identificação das leveduras produtoras de pectinase.....	31
4.3 Atividade da poligalacturonase (PG) em meio líquido.....	34
4.4 Avaliação da atividade de pectina liase (PL) em meio líquido.....	36
4.5 Determinação de protease.....	37
4.6 Determinação das propriedades da enzima poligalacturonase (PG).....	40
4.7 Determinação da atividade de PG nas amostras dialisadas.....	48
4.8 Determinação da massa molecular aproximada (SDS PAGE).....	49
4.9 Determinação do modo de ação da poligalacturonase.....	51
4.10 Determinação de pectina metil esterase (PE).....	55
5 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXOS.....	69
APÊNDICE.....	72

RESUMO

SILVA, Evânia Geralda. **Seleção de leveduras pectinolíticas isoladas de frutas tropicais**. 2003. 79 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras, Lavras MG*.

Enzimas pécnicas são usadas em vários processos industriais como processamento de frutas e vegetais, clarificação de sucos de frutas, extração de óleos, fermentação de chá, café e cacau, produção de vinho e tratamento de fibras têxteis. As pectinases são produzidas por bactérias, fungos filamentosos e também por leveduras. No entanto, as pectinases comerciais são produzidas por fungos filamentosos há mais de 50 anos, juntamente com outras enzimas como celulases, glucanases, amilases, esterases e arabinofuranosidades, o que dificulta o processo de purificação da enzima e encarece o produto final. As leveduras apresentam-se em grande diversidade no ambiente, são encontradas no solo e flores e frutos são substratos apropriados para sua colonização. As leveduras apresentam vantagens em relação aos fungos filamentosos quanto à produção de enzimas, pois possuem natureza unicelular, o seu crescimento é relativamente simples e o meio de crescimento não requer indutor. Considerando que o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de leveduras de frutas tropicais quanto à produção de pectinases, as leveduras foram testadas quanto à produção de poligalacturonase, pectina liase e pectina metilesterase. De um total de 300 leveduras isoladas de frutas tropicais, 21 foram positivas para poligalacturonase dessas, 6 foram positivas para pectina liase e nenhuma levedura apresentou atividade positiva para pectina metilesterase. As leveduras foram identificadas de acordo com métodos tradicionais e foram encontrados os gêneros: *Stephanoascus* (5), *Candida* (4), *Debaryomyces* (3), *Pichia* (3), *Zygosaccharomyces* (2), *Zygoascus* (2) e duas possíveis novas espécies. A atividade de poligalacturonase das 21 leveduras foi determinada por espectrofotometria. Dentre as leveduras testadas, a levedura *Zygoascus helenicus* (185) mostrou melhor resultado em pH 4,5, na temperatura de 35°C sendo de 0,235mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína, valor próximo ao resultado obtido por *Kluyveromyces marxianus* (CCT3172) utilizada como controle, 0,24mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína a pH 4,5 a 40°C. Os demais isolados apresentaram baixa secreção da enzima. Para a atividade de endopoligalacturonase, a levedura *Debaryomyces hansenii* (SL-140) demonstrou maior decréscimo na viscosidade, 5000 UVR. As leveduras produzem pectinases, porém em menor proporção que o melhor produtor industrial, *Aspergillus niger*.

*Comitê de orientação: Rosane Freitas Schwan – UFLA (Orientadora), Roberta Hilsdorf Piccoli-Valle (Co-orientadora).

ABSTRACT

SILVA, Evânia Geralda. Selection of pectinolytic yeasts isolated from tropical fruits. 2003. 79 p. Dissertation (Master in Agriculture Microbiology) Universidade Federal de Lavras, Lavras MG*.

Pectic enzymes are used in several industrial process such as vegetable and fruit processing, clarification of fruit juices, extraction of oils, fermentation of tea, coffee and cocoa beans, wine production and textiles. Pectinases can be produced by bacteria, filamentous fungi and yeasts. However the commercial pectinases have being usually produced by filamentous fungi for more than 50 years. These enzymes are produced as a enzymatic complex constituted of cellulase, glucanase, amylase, esterases and arabino-furonosidases which is hard to process the purification step which increases the final price of the enzyme. The yeasts are usually present in a great diversity of environment and might be found in soil, flower and fruits which are appropriates substrates for the growth. The production of enzymes by yeasts is more vantages than the ones produced by filamentous fungi due to their unicellular growth, easy to cultivate and the culture medium does not require an enzymatic inductor. The main aim of this work was to evaluate the potential of yeasts isolated from tropical fruits in relation to pectinolytic enzymes. The yeasts isolates were tested in relation to polygalacturonase, pectin lyase and pectin methylesterase production. From a total of 300 isolates from tropical fruits, 21 were able to produce polygalacturonase and 6 of them were able to produce pectin lyase. None of the yeasts isolated were able to produce pectin methylesterase. The yeasts isolates were identified by traditional morphologic and biochemical methods and were found the following genera: *Stephanoascus* (5), *Candida* (4), *Debaryomyces* (3), *Pichia* (3), *Zygasaccharomyces* (2), *Zygoascus* (2) and two non identified isolates. Among the yeasts testes, the yeast *Zygoascus helenicus* (185) showed the highest enzymatic activity , 0.25 mM of galacturonic acid/min/ug of protein in pH 4.5, incubated at 35 ° C. This result was similar to the one observed from *Kluyveromyces marxianus* (CCT 3172), 0.24 mM/ of galacturonic acid/min/ug of protein in pH 4.5, incubated at 40 ° C used as the control strain. The other isolates showed low enzyme secretion. For endopolygalacturonase production the yeasts *Debaryomyces hansenii* (SL-140) showed quickly viscosity decreased (5000 RVU), which demonstrated the endo activity of polygalacturonase.

*Guidance Committee: Dr. Rosane Freitas Schwan - UFLA (Adviser), Roberta Hilsdorf Piccoli-Valle (Co-Adviser).

1 INTRODUÇÃO

As enzimas têm sido usadas pelas civilizações antigas há milhares de anos na fabricação de cerveja e pão. Atualmente as enzimas são principalmente usadas, em aplicações industriais como produção de alimentos, polpa e papel, lavanderias e têxtil. As indústrias de alimentos em especial utilizam as enzimas na produção de queijos, sucos de frutas, vinho, extração de óleo e outros. As enzimas são particularmente importantes para as indústrias de alimentos por diversas razões, entre elas porque ocorrem naturalmente no material biológico, não são tóxicas e possuem ação específica. O controle das reações enzimáticas é feito por ajuste de temperatura e pH (Godfrey & West, 1996)

O valor estimado para a venda de todas as enzimas industriais foi de 1 bilhão de dólares em 2002, dos quais 75 milhões foram devidos à comercialização de pectinases. Para o ano de 2005 espera-se em torno de 1,7 a 2 bilhões de dólares para as produções mundiais de enzimas industriais (Kashyap et al., 2001).

A primeira aplicação comercial das pectinases na produção de vinho e suco de frutas ocorreu em 1930 (Bhat, 2000). Entretanto, somente na década de 60 essas enzimas foram usadas com maior frequência (Bhat, 2000). As pectinases representam hoje excelente empreendimento no setor comercial, devido à sua grande aplicabilidade na indústria de alimentos.

As pectinases são um complexo de enzimas que degradam a pectina, um polissacarídeo constituinte da parede celular de plantas. Esse complexo enzimático inclui pectina liase, pectato liase, poligalacturonase e pectinesterase (Whitaker, 1984). Na indústria de alimentos, as pectinases são usadas no processamento de frutas e vegetais, na produção de vinhos, na extração de óleo de oliva e na fermentação de chá, café e cacau (Piccoli-Valle et al., 2001 a).

A produção de enzimas que degradam pectina inclui plantas, fungos filamentosos, bactérias (Hadj-Taieb et al., 2002) e algumas leveduras (Behere et al., 1993; Schwan et al., 1997). Preparações comerciais de pectinases são produzidas a partir de *Aspergillus niger* (Demir et al., 2001; Jia & Wheals, 2000; Galiotou-Panayotou et al., 1997; Manachini et al., 1988). As pectinases produzidas por esse fungo são de grande importância devido a sua aceitabilidade na indústria de processamento de alimentos e por ser um microrganismo registrado no GRAS (“generally regarded as safe”), o qual permite o uso de seus metabólitos na indústria de alimentos (Naidu & Panda, 1998; Varga et al., 1993). Os fungos filamentosos têm sido usados por mais de 50 anos na produção de enzimas industriais e produzem uma mistura de diferentes enzimas.

De acordo com Steele & Stowers (1991), produtos originados de microrganismos de ocorrência natural apresentam a vantagem de serem mais facilmente aceitos e aprovados para comercialização que os produtos oriundos por microrganismos manipulados geneticamente. Por esta razão, muitas indústrias são favoráveis à seleção de microrganismos de ocorrência natural.

As leveduras fazem parte do ambiente, sendo encontradas no solo, e as flores e frutos, são substratos apropriados para sua colonização. Assim, as leveduras podem ser uma alternativa para produção de enzimas pécnicas de grande eficiência e de menor preço.

Este trabalho teve como objetivos isolar, selecionar e identificar leveduras de frutas tropicais produtoras de pectinases, caracterizar pH e temperatura de atuação da poligalacturonase, bem como sua massa molecular aproximada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pectina

Pectina é uma complexa família de polissacarídeos que estão presentes principalmente em parede celular primária e regiões intercelulares de dicotiledôneas (Figura 1) (Ralet et al., 2001; Ridley et al., 2001).

A estrutura básica da pectina é composta por unidades de ácido D-galacturônico parcialmente metilados como principais componentes, com alguns resíduos de açúcares neutros nas cadeias laterais, sendo ramnose, galactose, arabinose (Rombouts & Pilnik, 1978). As moléculas são formadas por ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ (Figura 2) entre o grupo pirano e as unidades de ácido D-galacturônico. A estrutura da pectina é heterogênea, verificada pela variação de sua massa molecular na faixa de 30.000 a 300.000 Da (Rombouts & Pilnik,

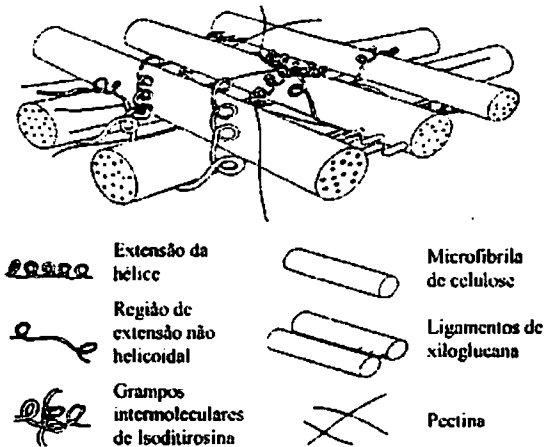


FIGURA 1 Modelo esquemático da parede celular primária de vegetal. Fonte: Sakai et al., 1993.

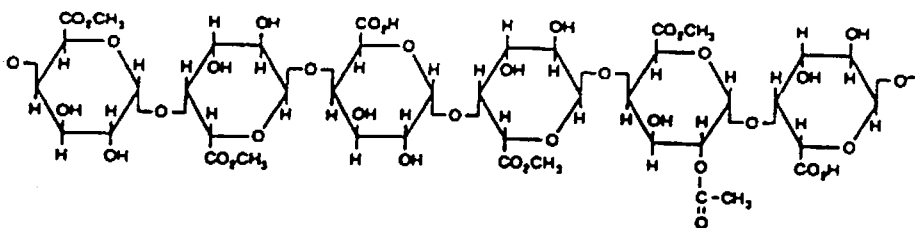


FIGURA 2 Fragmento de pectina com as unidades de ácido D-galacturônico.

Fonte: Sakai et al., 1993.

1978), do grau de esterificação e acetilação. A pectina é um material coloidal, responsável pela integridade e sustentação dos tecidos vegetais (Conteras-Esquivel et al., 1997).

As substâncias pécicas são macromoléculas de alto peso molecular (Alkorta et al., 1998) e classificadas em protopectina, ácido pécico, ácido pectínico e pectina, de acordo com o tipo de modificação da cadeia dorsal (Kashyap et al., 2001). Protopectina é a pectina na sua forma insolúvel, que é responsável pela firmeza da fruta. Ácidos pécicos são galacturonanas que possuem pequenas quantidades de grupos metil éster. Ácidos pectínicos são as galacturonanas com grande quantidade de grupos metil éster (Kilara, 1982). Pectina, um nome genérico, é uma mistura de diferentes composições contendo ácido pectínico como maior componente (Kashyap et al., 2001).

Cerca de 0,5-4% do peso fresco do material vegetal são substâncias pécicas e durante o amadurecimento a pectina é encontrada na fase líquida, causando um aumento da viscosidade. Após o processamento, frutas ricas em pectina produzem um suco com alta viscosidade, dificultando o rendimento da produção dos sucos industrializados (Kashyap et al., 2001).

2.2 Enzimas pécnicas

Pectinase é um nome genérico para uma família de enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas em polímeros pécnicos (Reid & Ricard, 2000). Diversas aplicações industriais, principalmente em indústrias de alimentos, incluem as pectinases. Além da aplicação industrial, as pectinases formam a primeira classe de enzimas produzidas durante a infecção da planta por microrganismos, o que proporciona a rápida degradação da parede celular e a morte da célula vegetal (Alghisi & Favaron, 1995). Essas enzimas são conhecidas como enzimas pécnicas, pectinases ou enzimas pectinolíticas.

2.2.1 Classificação

São classificadas em dois grupos principais, de acordo com seu modo de ação (Figura 3) na cadeia de pectina: desmetoxilantes e despolimerizantes (Blanco et al., 1999).

A) Desmetoxilante

A-1) Pectina metilesterase (PE) EC 3.1.1.11 - conhecida também como Pectina metilhidrolase, desesterifica o grupo metoxil da pectina formando ácido pécnico e metanol ($\text{pectina} + n\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{metanol} + \text{pectato}$). As propriedades físico-químicas do polímero pécnico são ditadas pelo grau e distribuição da metil esterificação. Assim sendo, essa enzima desempenha um importante papel na natureza por variar as características da pectina, alterando o grau de esterificação, bem como degradando o polímero pécnico (Christgau et al., 1996).

B) Despolimerizantes

Essas enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas incluem:

B1) Poligalacturonase (PG) – catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 em ácido pécico (ácido poligalacturônico). De acordo com o modo de ação, podem ser endopoligalacturonase e exopoligalacturonase. As endopoligalacturonases, conhecidas como [poli (1,4- α -D-galacturonídeo) glicohidrolase, EC3.2.1.15], hidrolisam as ligações entre ácidos D-galacturônicos no ácido pécico. As exopoligalacturonases, conhecidas também como [poli (1,4- α -D-galacturonídeo) galacturonohidrolase, EC3. 2.1.67, galacturam 1,4- α -D-galacturonosidase], removem as moléculas de ácido D-galacturônico a partir da extremidade não redutora da molécula.

As poligalacturonases podem ainda ser classificadas em polimetilgalacturonases (PMG) (EC 3.2.1.15), as quais catalisam a hidrólise de ligações 1,4- α -glicosídicas abrangendo endo-PMG, que clivam ao acaso ligações 1,4- α -glicosídicas da molécula de pectina preferencialmente e altamente esterificadas, e exo-PME, que cliva em seqüência ligações 1,4- α -glicosídicas de grupo final não-redutores da cadeia de pectina. As PME atuam preferencialmente nas moléculas de ácido pectínico, já as PG atuam preferencialmente no ácido pécico.

B2) Pectina liase (PL) – conhecida como [poli (metoxigalacturonídeo) liase, EC 4.2.2.10], atua na pectina, catalisa a quebra de pectina por transeliminção, liberando ácido galacturônico Δ -4,5- insaturado. Esta enzima é descrita como pectina-transeliminase. As liases são divididas em endo-PL, que catalisa a clivagem ao acaso de ligações 1,4- α -glicosídicas na pectina, e exo-PL, que catalisa terminalmente a quebra da pectina por clivagem transeliminativa.

B3) Pectato liase (PAL) - conhecida como [poli (galacturonídeo) liase EC4.2.2.2], libera Δ -4,5-galacturonato de pectato e outros poligalacturonídeos.

B4) Protopectinase - esta enzima solubiliza protopectina, formando pectina polimerizada altamente solúvel.

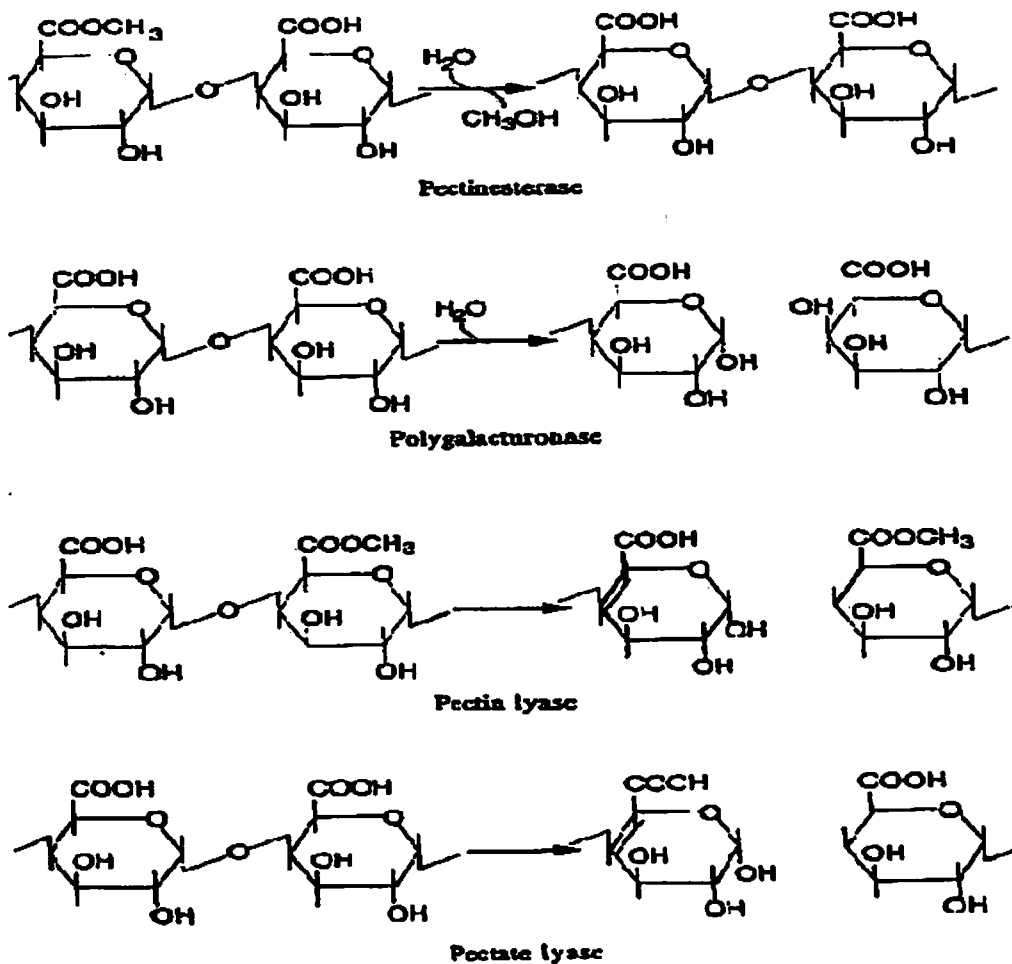


FIGURA 3 Mecanismo de ação de 4 pectinases. Fonte: Schwan 1994.

4.3- Produção de pectinases por microrganismos

Os microrganismos são hábeis em produzir diferentes tipos de enzimas, entretanto, para a melhor produção da enzima, é necessária uma seleção do microrganismo produtor e das condições que secreta a enzima. Além da seleção do melhor produtor, o microrganismo estudado também pode ser modificado geneticamente para aumentar o rendimento de produção da enzima de interesse.

As enzimas microbianas possuem vantagens em relação às enzimas de plantas e animais como baixo custo de produção, susceptibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, facilidade na manipulação genética, representam recurso renovável e espectro amplo de características físico-químicas de diferentes enzimas, geralmente relacionadas ao habitat e à fisiologia do microrganismo produtor (Lee, 1996). As enzimas microbianas são produzidas em grande escala em função do rápido crescimento dos microrganismos e da grande variedade de substratos utilizáveis por estes como resíduos agrícolas e industriais (Piccoli-Valle et al., 2001b).

As enzimas pécticas são sintetizadas e excretadas por bactérias, fungos filamentosos e algumas leveduras (Behere et al., 1993). Dentre a grande variedade de bactérias que sintetizam essas enzimas, destacam-se os gêneros *Erwinia*, produtoras de uma variedade de enzimas pectinolíticas extracelulares (Garibaldi & Bateman, 1971; Reid & Collmer, 1986), *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* (Aguilar & Huítron, 1987). Shevchik et al. (1992) analisaram quantitativamente poligalacturonase, pectina metilesterase e seis isoformas de pectato liase produzidas pela bactéria *Erwinia*. Sakiyama et al. (2001), isolaram de café cereja uma cepa de bactéria endofítica produtora extracelular de pectina liase com atividade máxima a 40°C e pH 7,9. Entre os fungos filamentosos produtores de pectinases destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Baracat et al., 1989). Diferentes poligalacturonases extracelulares são sintetizadas por fungos, são produzidas extracelularmente (Sakellaris et al.,

1988; Antov & Pericin 2000) e geralmente induzidas por poligalacturonídeos, ácidos galacturônicos e seus análogos.

Baracat et al. (1989) selecionaram fungos filamentosos com atividade pectinolítica, adicionando ao meio de cultura pectina cítrica como indutor. Baracat-Pereira et al. (1994) produziram pectina liase de *Penicillium griseoroseum* adicionando ao meio 0,1% de pectina cítrica. Antov & Pericin (2001) induziram a produção de pectinases em *Polyporus squamosus* com pectina. Fraissinet-Tachet & Fevre (1996) induziram a produção de poligalacturonase e outras pectinases em *Sclerotinia sclerotiorum* pela adição de ácido galacturônico. A Tabela I mostra as características físico-químicas de algumas pectinases secretadas por microrganismos.

Os fungos filamentosos têm sido usados há mais de 50 anos na produção de enzimas industriais. Contudo, a maior parte deles são produtores de diversas enzimas simultaneamente, sendo o produto comercial uma mistura de diferentes enzimas (Dalbøge, 1997). Esta mistura possui algumas desvantagens, como a impossibilidade de conhecer o modo de ação da mistura enzimática e de obter a produção de uma enzima específica. Assim, estudos são conduzidos para a busca de novos microrganismos produtores de enzimas. A partir da seleção de microrganismos, tem-se também estudado a manipulação genética para aumentar a produção, como desenvolvimento de sistemas de expressão, clonagens, purificação de enzimas, determinação da seqüência de aminoácidos e subsequente hibridização com sondas específicas em bibliotecas genômicas (Dalbøge, 1997).

TABELA 1 Características físico-químicas de pectinases purificadas.

Microrganismo	Pectinase	pH de Ativid.	T. (°C)	MM (KDa)	Pi	Referência
<i>Penicillium griseoroseum</i>	Pectina liase	6,0	50	-	-	Brumano et al. 1993
<i>Termonascus auranticus</i>	Pectina liase	10,5-11	60	-	-	Martins et al, 2002
<i>Penicillium italicum</i>	Pectina Liase	6,0-7,0	40	22	8,6	Alaña et al, 1990
<i>Aspergillus awamori</i>	Poligalacturonase	5,0	30-40	-	-	Nagai et al, 2000
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Endopoligalacturonase	5,0	40	47,41 35,33	5,9;5,6; 5,3	Schwan et al 1997
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Endopoligalacturonase	5,5	45	-	-	Bianco et al, 1994
<i>Bacillus subtilis</i>	Exopoligalacturonase	8,0	55	105	5,0	Sawada & Ueda, 2001
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Poligalacturonase	8,2-9,8	30	30-36	7,9-9,1	Garibaldie & Bateman, 1971
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Poligalacturonase	4,5	30	-	-	Sakellaris et al.,1988
<i>Cryptococcus albidus</i>	Endopoligalacturonase	3,75	37	41	8,1	Federici, 1985

Em leveduras, as enzimas pécticas não são bem relatadas como em bactérias, fungos filamentosos e plantas. Luh & Phaff (1951) foram os primeiros autores a descrever a produção de endopoligalacturonase em *Saccharomyces fragilis* (renomeada *Kluyveromyces marxianus*, Barnett et al., 2000). A partir de 1951 outros autores também relataram a produção de pectinases em leveduras, como a produção de poligalacturonase, pectina liase e pectinesterase por *Saccharomyces cerevisiae* (Gainvors et al., 1994; Gainvors & Belarbi, 1996).

Blanco et al. (1999) relataram que pectinases são constitutivas em leveduras, já que pectina, ácido poligalacturônico e ácido galacturônico não são requeridos para induzir a síntese dessas enzimas. Entretanto, segundo os autores, algumas espécies como *Candida albida*, *Geotrichum lactis* e *Kluyveromyces fragilis* (renomeada *K. marxianus*, Barnett et al., 2000) têm sido descritas como produtoras induzidas de pectinases. Poligalaguronase (PG) de *Saccharomyces fragilis* é parcialmente constitutiva, pois a atividade de PG é mais alta após crescimento em 2% de glicose com 1,8% de pectina do que o crescimento de células somente com 1% de glicose. A produção de pectinases pode ser afetada pela concentração de oxigênio, dissolvido no meio de cultura, a concentração de glicose e outros fatores menos estudados, como o pH do meio, a quantidade de inóculo, o número de células, o tempo de incubação e a fonte de nitrogênio (Blanco et al., 1999). As pectinases de leveduras são enzimas exocelulares, variando no peso molecular, e são de natureza glicoprotéica, algumas espécies de leveduras, como *S. fragilis* e *K. marxianus*, secretam várias isoenzimas (Blanco et al., 1999). Segundo esses autores, as enzimas pécticas apresentam um pH ótimo entre 3,5 e 5,5 e temperatura entre 40-55°C. De acordo com Sakai et al. (1993), endopoligalacturonases possuem pH ótimo de 4,0-6,0 e temperatura de 30-40°C. As pectinases produzidas por leveduras são principalmente endopoligalacturonases, as quais degradam por hidrólise as ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$, (Blanco et al., 1999).

A função dessas enzimas em leveduras é inteiramente desconhecida, sendo importante salientar que as leveduras não utilizam pectina, pectato ou a hidrólise desses produtos como fonte de carbono (Schwan et al., 1997). Para as leveduras é atribuído mais que um papel ecológico de um nível trófico da cadeia alimentar, podendo estar envolvidas na colonização do fruto causando uma quebra do tecido da planta e concomitante perda de açúcar da célula da planta,

que pode então ser utilizada para o crescimento da levedura, causando o apodrecimento do fruto (Blanco et al., 1999).

As enzimas pécticas de leveduras podem ser utilizadas na indústria de alimentos, especialmente no processamento de frutas e vegetais, para aumentar a produção e clarificação de sucos de frutas (Blanco et al., 1999). A principal fonte de enzimas pécticas para a indústria é o *Aspergillus niger*, pois produz grande quantidade dessas enzimas (Solis et al., 1996). Algumas preparações comerciais de pectinases contêm outras enzimas além das pectinases PG, PL e da indesejável PE (Blanco et al., 1999), como as esterases, amilases e celulasas (Jia & Wheals, 2000). Também podem conter hemicelulasas (Behere et al., 1993), xilanases, arabinases, galactanases, proteases, fenolase e catalases (Kilara 1982) e arabinofuranosidase (Barnby et al., 1990). Poligalacturonases de leveduras são boas alternativas para preparações comerciais dessas enzimas, principalmente na preparação do vinho. A cepa de levedura pectinolítica *Saccharomyces cerevisiae* do vinho pode melhorar a liquefação, clarificação e filtração do mosto de uva (Blanco et al., 1999).

As leveduras apresentam vantagens em relação aos fungos filamentosos quanto à produção de pectinases, pois possuem natureza unicelular, o seu crescimento é relativamente simples e o meio de crescimento não requer indutor. No caso de *K marxianus*, a levedura é capaz de produzir 90% de endopoligalacturonase do total de proteína secretada comparada à mistura bruta produzida, segundo Phaff & Demain (1956). Diante dessas vantagens, da possibilidade de clonagem e manipulação para melhoramento de produção e tendo em vista que *Saccharomyces cerevisiae* é largamente usada como organismo modelo e quase toda cepa é geneticamente derivada de S288C, cujo genoma tem sido seqüenciado (Jia & Wheals, 2000), sugere-se que a produção de enzimas de leveduras seja possível. Além disso, os fungos produzem

diversas enzimas que dificultam e encarecem o processo de separação da proteína.

2.4 Aplicação das pectinases

2.4.1 Processamento de sucos de frutas

As enzimas têm sido utilizadas em domicílio para processamento de alimentos desde os tempos antigos. As enzimas de origem microbiana possuem papel relevante na área de alimentos, pois estão relacionadas com a composição, processamento e deterioração dos alimentos. A produção de enzimas de origem microbiana, como celulasas e hemicelulasas, começou no início da década de 1980, primeiro na alimentação animal, seguido por aplicações em alimentos (Cao et al., 2000). Posteriormente essas enzimas foram usadas em indústrias têxteis, lavanderias e indústrias de polpa e papel (Cao et al., 2000). Nas últimas duas décadas, o uso de celulasas, hemicelulasas e pectinases têm aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias de alimentos e na indústria de papel. Atualmente, estas enzimas ocupam aproximadamente 20% do mercado mundial de enzimas (Bhat, 2000). A adição de pectinases em alimentos diminui a viscosidade e causa a agregação de partículas escuras, que se sedimentam e são removidas por centrifugação e/ou filtração (Demir et al., 2001; Sarioglu et al., 2001; Martins et al., 2002), facilitando a concentração do produto.

Existe uma grande diversidade de frutas no Brasil, sendo muitas de importância econômica, pois são usadas na produção de sucos e processamento de alimentos (Trindade et al., 2002). O consumo de sucos de frutas e vegetais é importante para a saúde humana e para o setor comercial. A variedade de componentes nutricionais das frutas e vegetais e a ampla faixa de consumidores facilitam a produção desses sucos. A produção de sucos de frutas e vegetais requer métodos de extração, clarificação e estabilização. A maceração, processo em que o tecido vegetal é convertido em uma suspensão de células intactas,

de hidróxido de sódio (NaOH 12 - 20%) em altas temperaturas, o que pode danificar as fibras (Brühlmann et al., 1994). A utilização de enzimas do complexo pectinolítico, bem como celulasas e hemicelulasas para a degomagem, possui algumas vantagens, como a redução da poluição ambiental, do consumo de produtos químicos e de energia, além da possibilidade da reutilização da enzima em vários ciclos de preparo das fibras vegetais (Kashyap et al., 2001; Sawada & Ueda, 2001).

2.4.3 Produção de vinho

A produção de vinho é um processo biotecnológico em que leveduras e enzimas representam o papel chave da produção, pois a produção requer a extração do suco e subsequente fermentação do suco por leveduras (Colagrande et al., 1994). O melhoramento de cepas de levedura, usadas na fermentação do suco da uva, bem como de enzimas exógenas microbianas, tem sido feito nas últimas quatro décadas. As três principais enzimas exógenas usadas na produção de vinho são pectinases, β -glucanase e hemicelulasas. Os principais benefícios do uso dessas enzimas durante o processamento são: melhoria na extração e maceração da casca e desenvolvimento da cor, facilidade de filtração e clarificação, melhora na estabilidade e qualidade do vinho e aumento do nível de terpenos do vinho (Bhat, 2000). O metanol pode ser um subproduto do vinho tratado com enzimas, o qual surge da desmetilação devido à ação de pectinesterase. Entretanto, os níveis de metanol são geralmente abaixo de 0,1%, por causa dos baixos níveis de substâncias pécticas metiladas na uva (Dekker, 1994).

2.4.4 Extração de óleo

A extração de óleos de semente de canola, girassol, coco, amêndoa, palmeira e oliva é feita normalmente com solventes orgânicos como hexano, que

é um cancerígeno em potencial. Enzimas que degradam a parede celular, como pectinases, podem ser usadas para a extração de óleos vegetais por um processo aquoso, por liquefação dos componentes da estrutura da parede celular, facilitando a extração do óleo (Kashyap *et al.*, 2001). A mistura enzimática comercial Olivex, que é uma preparação de pectinase com baixos níveis de celulase e hemicelulase produzidas por *Aspergillus aculeatus*, foi a primeira mistura enzimática usada para melhorar a extração de óleo de oliva (Bhat, 2000). Estudos metódicos ocorridos no final da década de 80 revelaram que uma só enzima não foi adequada para uma maceração e extração eficiente do óleo de oliva. Foram indispensáveis três tipos de enzimas, pectinases, celulases e hemicelulases, para a extração ideal do óleo. As principais vantagens do uso da maceração enzimática para a extração de óleo de oliva são: aumento da extração em presença de calor, melhora a centrifugação, obtenção de óleos com altos níveis de antioxidantes e vitamina E, indução lenta ao ranço, completo proveito da planta e baixo gasto de água (Bhat, 2000).

2.4.5 Fermentação de chá, café e cacau

Pectinases são importantes na fermentação de chá, café e cacau. Microrganismos pectinolíticos são usados na fermentação do café para a remoção da mucilagem dos grãos, pois a rápida degradação da mucilagem é importante para a melhoria da qualidade da bebida de café. Sendo a mucilagem um meio rico para a proliferação de microrganismos, favorece a produção de metabólitos que podem alterar a qualidade da infusão. Sendo assim, a presença dessas enzimas nos grãos de café pode servir como parâmetro da qualidade da bebida (Silva *et al.*, 2000). Celulases e hemicelulases, presentes nas misturas enzimáticas, ajudam na degradação da mucilagem acelerando a fermentação do café, pois o tempo é reduzido de 40-80 horas para apenas 20 horas.

O chá é uma bebida estimulante, mais consumida e mais antiga do mundo (Murugesan et al., 2002); os primeiros relatos da produção e consumo de chá datam de 27 a.C. é considerado uma das mais antigas bebidas produzidas via biotecnológica pelo ser humano. Os maiores produtores de chá são China, Índia, Srilanka, Japão, Kenia e Indonésia. As pectinases fúngicas usadas em preparações dessa bebida aceleram o tempo de fermentação, evitam a formação de espumas e ajudam na formação de sua propriedade instantânea por destruir as pectinas (Kashyap et al., 2001).

A polpa de cacau é um meio rico para crescimento microbiano. As leveduras tendem a dominar a fase inicial do processamento de fermentação natural e algumas espécies são capazes de secretar pectinases, sendo essas enzimas necessárias na cura do cacau para a degradação da mucilagem (Schwan et al., 1997; Schwan & Wheals, 2003).

2.5 Pectinases comerciais

As preparações comerciais de enzimas pecticas são manufaturadas por vários países da Europa, Japão e EUA, como mostra a Tabela 2. A principal fonte de microrganismo é o *Aspergillus niger*, pois produz grande quantidade de uma mistura complexa de pectinases, como endo e exo-PG, PL e pectina metilesterase, sendo essa última indesejável para a indústria (Blanco et al, 1999). Outras enzimas, como amilases e arabinofuranosidases, também estão presentes na mistura (Blanco et al, 1999). Devido à complexidade da mistura enzimática, a purificação, para caracterização da enzima, é de importância e tem um empreendimento considerável (Dalbøge, 1997).

TABELA 2 Fontes de pectinases comerciais.

Fornecedor	Localização	Nome comercial
C.H.Boehringer Sohn	Ingelheim - Alemanha	Panzym
Ciba-Geigy A.G.	Basel, Suíça	Ultrazyme
Grinsteelvaeket	Aarhus, Dinamarca	Pectolase
Kikkoman Shoyu, Co	Tokyo, Japão	Sclase
Schweizerische Ferment, A G.	Basel, Suíça	Pectinex
Societe Rapidase, SA	Seclin, França	Rapidase, Clarizyme
Wallerstein, Co.	Des Plaines, EUA	Klerzyme
Rohm, GmbH	Darmstadt, Alemanha	Pectinol, Rohament

FONTE: Kashyap et al., 2001

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo: Fonte e manutenção

Trezentas leveduras foram isoladas de diferentes frutas tropicais, dentre elas acerola (*Malghia glabra*), ata-pinha (*Annona squamosa*), bacuri (*Platonia insignis*), cacau (*Theobroma cacao*), cajá (*Spondias lutea*), cirigüela (*Spondias purpurea*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum schum*), graviola (*Annoma muricata*), jabuticaba (*Myrciaria cauliflora berg*), jenipapo (*Genipa americana*), lulo (*Solanum tuberosuoum*), mangaba (*Hancornia speciosa*), maracujá (*Passiflora edulis*), pitanga (*Eugenia uniflora*), pseudolulo (*Solanium pseudolulo*), sapoti (*Manilkara zapota L., van Royen*) e umbu-cajá (*Spondias tuberosa*). Foram analisadas frutas frescas e polpas de frutas da CEPLAC- BA e Fortaleza (EMBRAPA) e Corpoica-Medelim (Colômbia). As leveduras isoladas foram mantidas a 4°C em meio nutriente, YW, com a seguinte composição em g/L de água destilada: extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona de soja 5,0 e glicose 10,0.

3.2 Seleção de leveduras para a atividade de poligalacturonase (PG)

As culturas de leveduras isoladas e purificadas foram inoculadas em 1 mL de meio de cultura complexo YW e incubadas por 24h a 28°C, formando uma pré-cultura. Após, 3µL foram inoculados em placa de Petri contendo meio MP5 com a seguinte composição em g/L: glicose 5,0; ácido poligalacturônico 5,0; KH₂PO₄ 4,0; Na₂HPO₄ 6,0; extrato de levedura 1,0; (NH₄)₂SO₄ 2,0; ágar 15,0 e 1 mL das soluções, FeSO₄ 0,2g/200mL, MgSO₄ 40g/200mL; CaCl₂, 0,2g/200mL; H₃BO₃ 0,002g/mL; MnSO₄ 0,002g/mL; ZnSO₄.7H₂O, 0,014g/mL; CuSO₄.5H₂, 0,01g/mL; MoO₃ 0,002g/mL; e incubadas por 48h a 28°C. A atividade de PG foi indicada pela formação de um halo claro ao redor da colônia


após a precipitação do ácido poligalacturônico com 1% de brometo de cetil trimetil amônio (cetrimida) (Hankin & Lacy, 1984). A levedura *Kluyveromyces maxianus* (CCT-3172) foi usada como controle positivo para essa enzima.

3.3 Identificação das leveduras produtoras de pectinases

Os isolados produtores de pectinases foram caracterizados por métodos tradicionais morfológicos e bioquímicos usados em taxonomia de leveduras (Barnett et al., 2000). Os testes fisiologicamente usados para a fermentação foram: D-glicose, D-galactose, sacarose, maltose, lactose e rafinose; de crescimento: D-glucose, D-galactose, L-sorbose, sacarose, maltose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melizitose, inulina, amido, D-xilose, L-arabinose, D-arabinosa, D-ribose, L-rhamnose, D-glucosamina, N-acetil D-glucosamina, metanol, etanol, glicerol, eritritol, galactitol, D-manitol, D-glucitol, xilitol, salicina, D-gluconato, DL-lactato, succinato, citrato inositol, como fonte de carbono; crescimento em nitrito, nitrato, L-lisina, etilamina e cadaverina como fonte de nitrogênio, crescimento a 30, 35, 37, 40 e 45°C; crescimento em meio com 50% e 5% de glicose e com 10% de NaCl; reação de cor Diazonium Blue B e resistência para 0,01% e 0,1% de cicloheximida. A identificação foi verificada usando chave descrita por Barnett et al. (2000).

3.4 Seleção de leveduras para a atividade de pectina liase (PL)

As leveduras produtoras de PG foram testadas quanto à produção de PL. As leveduras foram inoculadas, com alça de platina, em 1mL de meio de cultura YW, crescidas por 24h a 28°C, formando uma pré-cultura. Em seguida, 3μL do meio foram inoculados em placa de Petri, contendo meio de cultura complexo MP7 com a seguinte composição em g/L: glicose, 5,0; extrato de levedura, 1,0; pectina, 5,0; (NH₄)₂SO₄, 2,0; KH₂PO₄, 4,0; Na₂HPO₄, 6,0; FeSO₄.7H₂O, 0,2;



MgSO₄, 0,2 e CaCl₂, 1,0 mg; H₃BO₃, 10 µg; MnSO₄, 10µg; ZnSO₄, 70µg; CuSO₄, 50 µg; MoO₃, 10 µg com pH ajustado para 7,0 (Hankin & Lacy, 1984). Após crescimento por 48h a 28°C, as placas foram inundadas com cetrimida 1%. A análise positiva foi indicada pela formação de um halo claro ao redor da colônia de levedura, tendo como controle positivo enzima comercial Pectinex (10µL/L).

3.5 Determinação do número de células para a produção de enzimas em meio líquido

As culturas de leveduras foram inoculadas em 1000mL de meio de cultura complexo YW, pH 7,0 e incubadas por 72h a 28°C, sob agitação. A densidade óptica foi medida a 600nm (Shimatzu –UV1601 PC) contra uma curva de calibração apropriada. O número de células foi determinado, em alíquotas de 1mL, em câmara de Neubauer.

A curva de calibração do número de células foi determinada com o crescimento da levedura IC-50, em 1000mL de meio artificial mineral YW, incubadas por 72h a 28°C, sob agitação. A densidade óptica foi medida a 600nm em espectrofotômetro (Shimatzu – UV1601PC). Após crescimento, o meio de cultura foi centrifugado a 4800 rpm por 10 minutos e o “pellet” foi recolhido em eppendorf para a determinação da massa seca, seco em estufa a 60°C e pesado até a manutenção do peso constante.

3.6 Produção de enzima

Para a produção de enzima foram inoculados 10⁸ cel/mL a 50 mL de meio artificial YW pH 7,0, monitorado pela densidade óptica a 600 nm, e fez-se a contagem do número de células viáveis em câmara de Neubauer, em 24 e 48h de crescimento. As células foram crescidas em frasco erlenmeyer, por 48h, sob baixa agitação a 28°C, e depois centrifugadas a 4800 rpm por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante, considerado a solução enzimática bruta, foi recolhido e usado como fonte de enzima extracelular.

3.7 Ensaio enzimático

3.7.1 Poligalacturonase (PG)

A atividade de poligalacturonase foi medida pela liberação de grupos redutores com ácido 3,5 dinitrosalicílico (ADNS) como reagente de análise, pelo método de Miller (1959), e o ácido galacturônico foi utilizado como padrão. A mistura de reação constou de 0,75 mL de sobrenadante da cultura e 0,5 mL de substrato com a seguinte composição: 0,5% de ácido poligalacturônico em meio mineral mínimo composto de 0,62 g K_2HPO_4 ; 2,0g KH_2PO_4 ; 0,1g $MgSO_4$; $(NH_4)_2SO_4$ por litro, com pH ajustado para 5,5 com NaOH após a adição de ácido poligalacturônico. A incubação foi a 40°C por 60 minutos e a reação foi paralisada pela adição de 1,25 mL de ADNS, após a mistura foi colocada em banho-maria fervente por 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 575nm contra um tubo branco, contendo a mistura de reação com a adição do ADNS, seguida da fervura por 5 minutos. Os resultados obtidos foram extrapolados em uma curva padrão de ácido galacturônico (anexo A figura 3). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os resultados da atividade enzimática de poligalacturonase foram submetidos à análise estatística pelo método de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.7.2 Determinação de Proteína total

A proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976) tendo como padrão albumina de soro bovino (BSA). A mistura de reação constou de 1200 μ L da solução enzimática bruta e 300 μ L do reagente de Bradford, em triplicata, com leitura a 595 nm.

Uma unidade enzimática U foi definida como mM de ácido galacturônico liberado/min/ μ g de proteína .

3.7.3 Pectina liase (PL)

A atividade de pectina liase, no sobrenadante da cultura (YW pH 7,0) em três frascos de cultivo, foi determinada pelo aumento da absorvância a 235 nm, como descrito por Albersheim (1966), usando um coeficiente de extinção de 5500 L mol/cm. Em todos os cultivos a densidade óptica a 600 nm, com 24 e 48h de crescimento, foi medida e o número de células viáveis foi contado em câmara de Neubauer. A mistura de reação constou de 1 mL de pectina de citrus 2,5% (p/v), 85% de esterificação, em 100 mM de tampão fosfato pH 6,8 e 1,5 mL de sobrenadante da cultura, solução enzimática bruta. Alíquotas de 0,5 mL da mistura de reação foram incubados a 0, 10, 15, 20 e 30 minutos a 40°C. A reação foi paralisada com adição de 4,5 mL de HCl 0,01 M. As análises foram realizadas em triplicata. Enzima comercial Pectinex foi usada como controle positivo. Uma unidade enzimática (U) de pectina liase foi definida como μ mol/min de grupos uronídeos insaturados/mL do sobrenadante da cultura.

A atividade de pectina liase também foi determinada no sobrenadante da cultura de meio MF pH 5,0, três frascos de cultivo, com a seguinte composição em g/L: glicose, 10; (NH₄)₂SO₄, 3,0; K₂PO₄, 4,5; extrato de levedura, 1,0; MgSO₄, 0,25; CaCl₂. 2H₂O, 0,25; e meio MP7 pH7,0; três frascos de cultivo, com 5% de pectina de citrus, 85% de esterificação, como indutor para essa enzima, sendo as análises realizadas em triplicata.

3.7.4 Determinação de protease

A atividade de protease foi determinada no sobrenadante da cultura crescida em meio MP7, de acordo com o método adaptado por Braga et al. (1998). A mistura de reação constou de 2 mL de solução de caseína 2% (p/v) em tampão tris HCl pH 9,0, e 1 mL de solução enzimática bruta seguido por incubação a 37°C por 60 minutos, centrifugação a 10.000 rpm por 6 minutos e leitura em espectrofotômetro a 280nm. Uma unidade enzimática (U) foi determinada por número de aminoácidos livres /min/mL.

3.7.5 Determinação de poligalacturonase com variação de tempo, temperatura e pH do substrato.

Para a produção de poligalacturonase, as leveduras foram cultivadas em 50 mL de meio artificial YW pH 7,0, acrescido de 0,5% de ácido poligalacturônico como indutor para enzima, e incubadas conforme descrito no item 3.6. O sobrenadante recolhido foi armazenado em freezer para análise posterior. A atividade de poligalacturonase foi determinada pelo método de Miller (1959), descrito no item 3.7.1, modificando-se o tempo de incubação (15, 30, 45 e 60 minutos), o pH do substrato (3,5; 4,5; 5,5 e 6,5) e a temperatura de incubação (30, 35, 40 e 45°C). Os resultados obtidos foram extrapolados em uma curva padrão de ácido galacturônico (anexo A, figura2). A proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando como padrão albumina de soro bovino, descrito anteriormente no item 3.7.2.

3.8 Purificação (diálise)

As leveduras foram cultivadas em 500 mL de meio mineral artificial YW pH 7,0, acrescido de 0,5% de ácido poligalacturônico, por 72h a 28°C, centrifugadas a 4800 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recolhido e colocado em saco de diálise (Medicell International Liverpool Road, London Ltd size 4-

22/32). Sob os sacos de diálise foram adicionados polietilenoglicol (PEG 20.000) (BDH Laboratory Supplies Poole-England), armazenado em geladeira overnight (Schwan et al., 1997). Após a concentração os sacos foram dialisados contra água por aproximadamente 3h, sob baixa refrigeração.

3.9 Determinação aproximada da massa molecular (SDS-PAGE)

Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada, como descrita por Laemmli (1970), para a determinação da massa molecular aproximada de poligalacturonase das leveduras 185 e 166, tendo como controle a levedura *K. marxianus* CCT-3172.

As amostras dialisadas foram liofilizadas (Freeze dryer Micro Modulyo) por aproximadamente 24h. As amostras liofilizadas foram dissolvidas em ácido tricloroacético 10%, deixadas em repouso por 30 minutos em banho de gelo, agitadas em vortex, centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos e o ácido tricloroacético foi retirado cuidadosamente. As amostras foram lavadas três vezes com etanol/éter 50%. Novamente as amostras foram liofilizadas, para remover resíduo de etanol/éter, em seguida misturadas com 100µL de tampão de amostra (apêndice), e aquecidas a 100°C por 10 minutos e aplicadas ao gel de eletroforese, sendo o gel de separação 12,5% bis-acrilamida (30%T; 2.67%C) (apêndice), e gel de empilhamento 6% (apêndice). A eletroforese foi executada em um sistema vertical modelo EPS-1001 da Amersham Pharmacia Biotech, com uma corrente de 30mA com azul de bromofenol para marcar o final da corrida. O tempo de duração foi de aproximadamente 4h15min. O gel foi corado com solução de comassie blue (apêndice) e descorado com solução de metanol com ácido acético (apêndice). As bandas obtidas foram comparadas com bandas de padrão de massa molecular (C 3187-SIGMA), sendo as massas de 45; 29; 20,1; 14,2; 6,5 kDa.

3.10 Determinação da atividade de endo-poligalacturonase (endo-PG)

A atividade de endo-PG foi determinada como descrita por Cooper & Wood (1975), para as 21 leveduras produtoras de poligalacturonase.

As atividades são expressas como unidade de viscosidade relativa (UVR), definida como $10^3 \times$ o tempo recíproco (min) de 50% do aumento na viscosidade relativa da mistura de reação de 8,0 mL de solução de substrato contendo 3,2 g de ácido poligalacturônico, 0,062 g de K_2HPO_4 , 0,2 g de KH_2PO_4 , 0,001g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $(NH_4)_2SO_4$ para um volume final de 100 mL de solução a pH 5,0 e 2,0 mL de solução enzimática em viscosímetro Technico (200) a $25 \pm 0,01^\circ C$ (Schwan et al., 1997). O tempo foi cronometrado de 1 a 3 minutos.

3.11 Determinação de pectina metilesterase (PE)

Para determinação de PE, as leveduras foram cultivadas em 50 mL de meio YW pH 7,0, acrescidos de 1% de pectina de citrus (85% de esterificação); foram incubadas a $28^\circ C$ sob baixa agitação por 48h em banho-maria, centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido para a análise de PE.

As amostras foram filtradas em membrana de nitrato de celulose com $0,45\mu m$, em seguida adicionou-se 1mL de padrão interno (201,88mg de tolueno/100mL de etanol) em 0,5 mL de amostra, para posterior aplicação de 1 μ L em cromatógrafo gasoso Varian CG 3800 versão 4.5, coluna Cwax, com um tempo de retenção de 11min.47s.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de leveduras para a atividade de poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL)

Trezentos isolados de leveduras de frutas tropicais foram avaliadas quanto à capacidade de produzir e secretar pectinases em meio de cultivo sólido contendo ácido poligalacturônico e glicose e/ou galactose como fonte de carbono. As culturas de leveduras foram inoculadas em meio MP5 + glicose e MP5 + galactose para a avaliação da atividade de poligalacturonase e MP7 para a avaliação da secreção de pectina liase. Dentre as 300 leveduras avaliadas, somente 21 apresentaram resultado positivo, pela formação de halo claro (Tabela 3), para a atividade de poligalacturonase em meio MP5-glicose e MP5-galactose. Somente a levedura SL-140 apresentou resultado negativo, ou seja, sem a formação de halo em MP5-glicose, e resultado positivo no meio de cultivo que continha galactose como fonte de carbono (MP5-galactose) (Tabela 3). As leveduras IC-50 e IC-54 foram capazes de secretar a poligalacturonase somente quando glicose foi a fonte de carbono adicional (Tabela 3).

TABELA 3 Produção de poligalacturonase e pectina liase detectada pela formação de halo claro após a precipitação do ácido poligalacturônico com cetrimida.

Levedura	MP5-glicose	MP5-galactose	MP7-para PL
185	+	+	+
166	+	+	-
168	+	+	+
162	+	+	-
CH-144A	+	+	-
36	+	+	+
IC-50	+	-	-
IC-54	+	-	-
CH-142A	+	+	-
SL-125	+	+	+
SL-140	-	+	-
CH-156A	+	+	-
CH-146A	+	+	-
147	+	+	+
FT-01	+	+	+
FT-175	+	+	-
53CO	+	+	-
FT20	+	+	-
FT-28	+	+	+
FT-35	+	+	-
IC-38	+	+	-

As leveduras FT-01, 168, 36, 147, FT-28, SL-125 e 185 (Tabela 2) foram capazes de secretar também pectina liase em meio MP7 (pH 7,0) contendo pectina (85% de esterificação). Gainvors et al. (1994) também detectaram pectina liase em *Saccharomyces cerevisiae*, isolada durante a fermentação do vinho.

A levedura SL-140 não cresceu em meio MP5-glicose, mas cresceu em MP5-galactose. Jia & Wheals (2001) verificaram que com estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para produzirem poligalacturonase, galactose foi melhor fonte de carbono do que glicose. Os resultados obtidos neste trabalho podem indicar que a levedura SL-140 secretou também a β -galactosidase.

Do total de isolados, 7% das leveduras isoladas de frutas tropicais apresentaram atividade pectinolítica. Como o habitat natural de leveduras é frutas maduras, é considerável que algumas estirpes desenvolvam atividade pectinolíticas para otimizar seu crescimento (Gainvors et al., 1994). Trindade et al. (2002) afirmam que a atividade pectinolítica pode ser uma vantagem como alternativa para quando se esgotarem fontes de carbono mais simples. Outros autores, como Blanco et al. (1999), afirmaram que a função dessas enzimas em leveduras é desconhecida. Schwan et al. (1997) afirmaram que pectina ou ácido galacturônico não é utilizado como fonte de carbono por leveduras.

É possível inferir que as leveduras de frutas tropicais produzem pectinases para degradar a pectina presente nas polpas das frutas, para assimilar os açúcares da cadeia lateral da pectina como ramnose, galactose e arabinose. A utilização desses açúcares pelas leveduras isoladas foi constatada nos testes bioquímicos utilizados na identificação à nível de espécie (Barnett et al., 2000).

4.2 Identificação das leveduras produtoras de pectinases

As 21 leveduras produtoras de poligalacturonase foram identificadas quanto ao gênero e espécie (Tabela 4) segundo métodos tradicionais morfológicos e bioquímicos de identificação de leveduras propostos por Barnett et al. (2000). Foram encontrados seis gêneros e 14 espécies diferentes de leveduras isoladas de frutas tropicais capazes de secretar pectinases. A morfologia celular e morfologia das colônias das leveduras, cultivadas em meio YW por 48h encontra-se nas figuras 4, 5 e 6. Todas as frutas utilizadas para o isolamento das leveduras foram frutas de clima tropical cultivadas na região da linha do Equador. As espécies encontradas (Tabela 4) foram também encontradas em outros ambientes, como flores e outros frutos (Lachance et al., 1982). A Tabela 3 também apresenta o nível de similaridade entre os isolados identificados e a espécie padrão descrita por Barnett et al. (2000). Em geral, níveis de similaridade abaixo de 85% podem indicar que a espécie não está bem descrita, que os números de testes realizados não foram suficientes, ou que trata-se de uma espécie nova. A última hipótese não é de causar surpresa, uma vez que no intervalo de 16 anos entre a relação de leveduras publicada por Krieger van Rij (1984) e a reportada por Kurtzman & Fell (1998) e Barnett et al. (2000), o número de espécies novas foi bastante significativo (1878 novas espécies). Os níveis mais baixos de similaridade foram observados nos isolados de FT-28 e 166 por isso, nas tabelas seguintes continuaremos a utilizar o código da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do DBI/UFLA.

A microbiota que compõe os exsudatos de árvores florestais contém leveduras e os isolados das espécies encontradas neste ambiente são adaptados às características nutricionais desses produtos, sendo as leveduras constatadas nesse meio espécies de *Pichia*, *Hansenula*, *Candida*, *Debaryomyces* e *Cryptococcus*, entre outras (Lachance et al., 1982). Santos et al. (1996) constataram comunidades de leveduras em flores e frutos tropicais e citaram a ocorrência de

vários gêneros entre eles *Cryptococcus*, *Rhodothorula* e *Sporobolomyces*. No estudo de frutos maduros e com podridões, esses autores detectaram leveduras dos gêneros *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Pichia* e *Candida*. Os gêneros *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces* também foram encontrados nos isolados das frutas examinadas neste trabalho.

Microrganismos pectinolíticos que ocorrem na fermentação de cacau e grãos de café estão envolvidos na maceração dos tecidos e grãos e incluem espécies de leveduras como *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* (Schwan & Wheals, 2003).

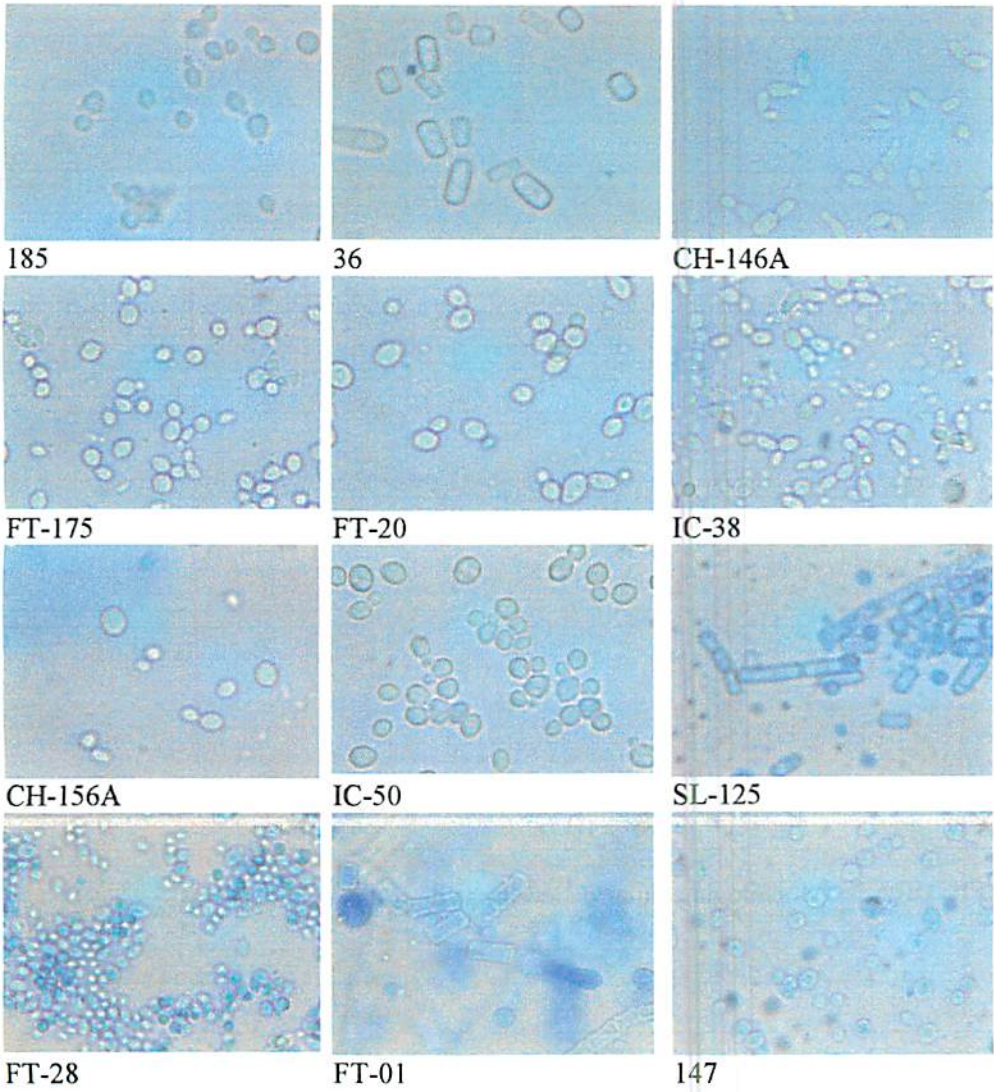


FIGURA 4 Morfologia celular de leveduras de frutas tropicais.

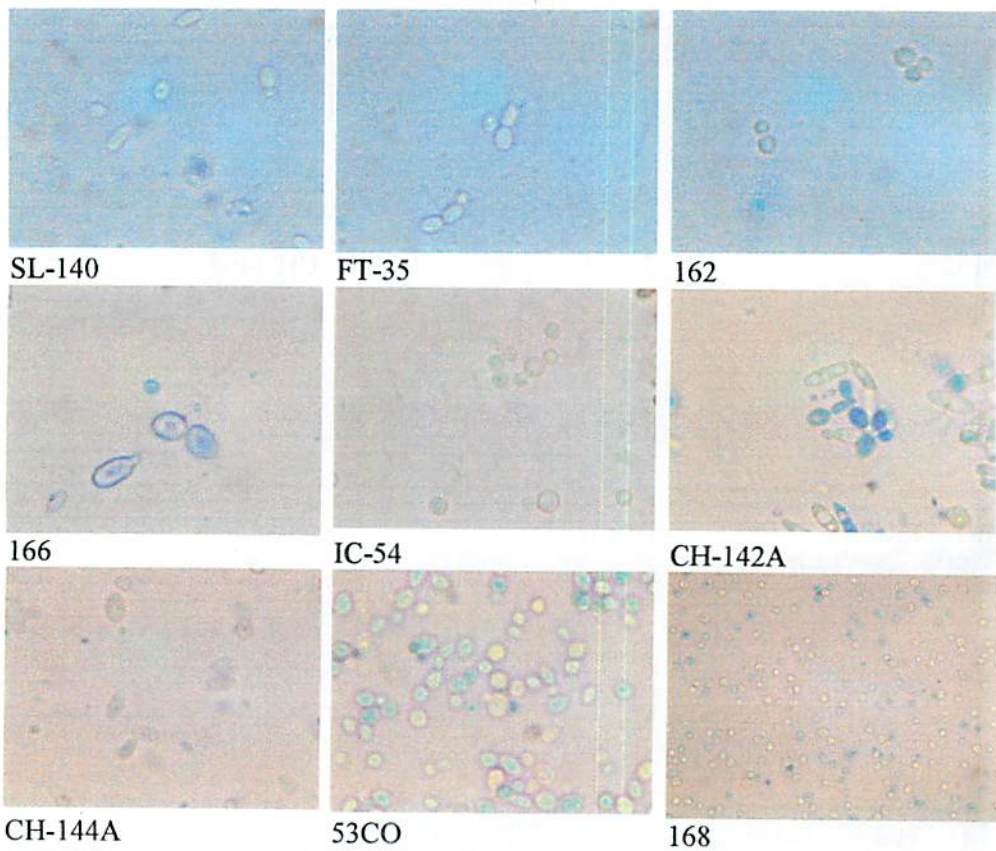
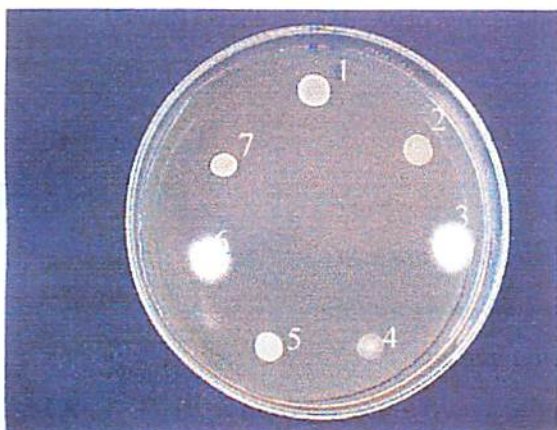
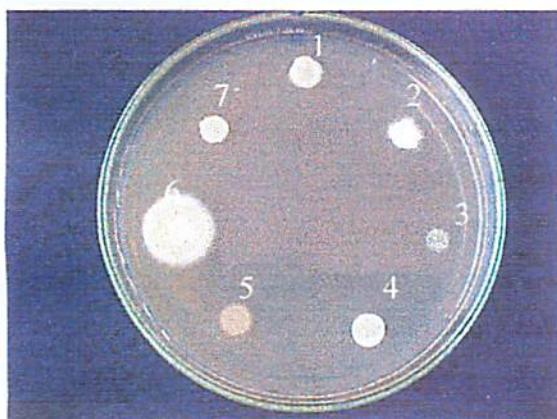


FIGURA 5 Morfologia celular de leveduras de frutas tropicais.



- 1- CH-146
- 2- FT-35
- 3- SL-125
- 4- SL-140
- 5- IC-38
- 6- FT-01
- 7- FT-20



- 1- FT-175
- 2- 147
- 3- 53CO
- 4- IC-50
- 5- IC-54
- 6- FT-28
- 7- CH-156A



- 1- CH-144A
- 2- CH-142A
- 3- 36
- 4- 162
- 5- 166
- 6- 185
- 7- 168

FIGURA 6 Morfologia das colônias de leveduras de frutas tropicais

TABELA 4 Identificação de leveduras isoladas de frutas tropicais, com o correspondente grau de similaridade com cepas de referência (Barnett et al., 2000).

Código	Fruta	Levedura	Similaridade (%)
185	Mangaba	<i>Zygoascus helenicus</i>	98,2
166	Mangaba	<i>Cândida nitratophila</i>	54,5
168	Mangaba	<i>Stephanoascus smithiae</i>	-
162	Mangaba	<i>Pichia angusta</i>	74,5
CH-144A	Cacau	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	89,5
36	Cajá	<i>Stephanoascus smithiae</i>	79,6
IC-50	Bacuri	<i>Zygoascus helenicus</i>	89,5
IC-54	Mangaba	<i>Stephanoascus smithiae</i>	85,5
CH-142A	Cacau	<i>Candida tenuis</i>	84,2
SL-125	Pseudo – lulo	<i>Pichia anomala</i>	89,5
SL-140	Pseudo – lulo	<i>Debaryomyces hansenii</i>	92,9
CH-156A	Cacau	<i>Pichia guilliermondii</i>	89,5
CH-146A	Cacau	<i>Zygosaccharomyces cidri</i>	77,2
147	Mangaba	<i>Stephanoascus smithiae</i>	92,9
FT-01	Cirigüela	<i>Stephanoascus smithiae</i>	92,9
FT-175	Mangaba	<i>Candida pseudoglaebosa</i>	92,9
53CO	Lulo	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	91,2
FT20	Umbu – cajá	<i>Debaryomyces hansenii</i>	94,7
FT-28	Umbu – cajá	<i>Pichia dryadoides</i>	48,2
FT-35	Cajá	<i>Candida intermedia</i>	87,7
IC-38	Bacuri	<i>Pichia guilliermondii</i>	96,5

4.3 Atividade da poligalacturonase (PG) em meio líquido

A atividade de poligalacturonase das 21 leveduras foi testada em meio líquido YW pH 7,0 no qual as leveduras foram cultivadas por 48h a 28°C. A quantidade de enzima foi relacionada com o crescimento celular. A atividade avaliada secretada foi por uma população aproximada de 10^8 cel/mL, que correspondeu a 1,87 mg de peso seco/mL (curva padrão do número de células no anexo). A quantidade de enzima secretada variou consideravelmente entre os isolados (Tabela 5). Foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade entre os isolados de leveduras na avaliação da atividade de poligalacturonase secretada em meio líquido. A levedura *Zygoascus helenicus* (185) foi a secretora mais ativa, apresentando 29,0 μ M de ácido galacturônico liberado/min/ μ g de proteína. Esta atividade foi 25% maior do que a atividade de poligalacturonase produzida por *Kluyveromyces marxianus* (CCT-3172), relatada por Schwan et al. (1997). As leveduras 166 e 168 apresentaram atividades enzimáticas semelhantes (14,2 e 12,9 μ M de ácido galacturônico liberado/min/ μ g de proteína), sendo aproximadamente a metade da quantidade secretada pela levedura 185. As espécies 162, CH-144A e 36 apresentaram atividade enzimática dez vezes menor que a melhor produtora, *Zygoascus helenicus* (185). As outras leveduras apresentaram atividade baixa de poligalacturonase, variando entre 0,098 a 0,96 μ M de ácido galacturônico/min/ μ g de proteína.

TABELA 5 Poligalacturonase produzida por leveduras isoladas de frutas tropicais em meio líquido, após 48h de incubação

Código	Levedura	Atividade (U)^a
185	<i>Zygoascus helenicus</i>	29,0d
166	-	14,2c
168	<i>Stephanoascus smithiae</i>	12,9c
162	<i>Pichia angusta</i>	3,3b
CH-144A	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	3,1b
36	<i>Stephanoascus smithiae</i>	1,7a b
IC-50	<i>Zygoascus helenicus</i>	0,96a
IC-54	<i>Stephanoascus smithiae</i>	0,87a
CH-142A	<i>Candida tenuis</i>	0,66 a
SL-125	<i>Pichia anomala</i>	0,62a
SL-140	<i>Debaryomyces hansenii</i>	0,61a
CH-156A	<i>Pichia guilliermondii</i>	0,53a
CH-146A	<i>Zygosaccharomyces cidri</i>	0,46a
147	<i>Stephanoascus smithiae</i>	0,46a
FT-01	<i>Stephanoascus smithiae</i>	0,36 a
FT-175	<i>Candida pseudoglaebosa</i>	0,34a
53CO	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	0,29a
FT20	<i>Debaryomyces hansenii</i>	0,21a
FT-28	-	0,16a
FT-35	<i>Candida intermedia</i>	0.15a
IC-38	<i>Pichia guilliermondii</i>	0,098a

^aU = μ M de ácido galacturônico/ μ g de proteína. Médias seguidas da mesma letra são iguais estatisticamente pelo teste Tukey (5%).

4.4 Avaliação da atividade de pectina liase (PL) em meio líquido

Os ensaios para avaliação da pectina liase em meio de cultivo MF pH 5,0; YW pH 7,0 e MP7 pH 7,0 tendo pectina como indutor não apresentaram atividade desta enzima. Pelos resultados obtidos, pode-se deduzir que a pectina presente no meio de cultura MP7 não induziu a produção de pectina liase, detectada pelo método de Albersheim (1966). Pectina é um indutor natural dessa enzima para fungos filamentosos, como os do gênero *Penicillium* (Piccoli-Valle et al., 2001 b). De acordo com Brumano et al. (1993), pectina induz a produção de PL por *Penicillium griseoroseum*. No entanto, pectina liase não tem sido frequentemente detectada em leveduras (Schwan et al., 1997), sendo bastante relatada como secretada por fungos filamentosos. Gainvors et al. (1994) relataram que *Saccharomyces cerevisiae* foi capaz de secretar pectina liase em meio de cultivo líquido a 30°C por 5 dias.

Fazendo uma comparação entre a composição dos três meios de cultivo, YW pH 7,0; MF pH 5,0 e MP7 pH 7,0, Baracat-Pereira et al. (1994) afirmaram que extrato de levedura, presente nos três meios de cultivo, não interfere na produção de PL para *Penicillium griseoroseum*. De acordo com Whitaker (1984), PL requer íons cálcio para expressar atividade, no entanto, este estava presente no meio de cultivo MF e MP7.

De acordo com Alafia et al. (1990) o pH ótimo de atuação dessa enzima foi entre 6,0 e 7,0 para *Penicillium italicum*. A atividade de PL verificada após o cultivo de *Penicillium griseoroseum* em um meio com pH inicial entre 5,6 e 8,0 não difere em níveis de 5% (Piccoli-Valle et al., 2001 a). O meio de cultivo para leveduras nesse trabalho foi a pH 5,0 e 7,0 e o substrato para a análise da atividade de PL foi a pH 6,8. Mais estudos terão que ser realizados com pH abaixo de 5,0 e acima de 7,0 para realmente comprovar o pH de atuação de PL para leveduras selvagens. De acordo com Piccoli-Valle et al. (2001 a),

experimentos para a atividade de PL com *Penicillium expansum* mostraram que apesar da atividade ótima a pH 7,0, a enzima é estável a pH 6,5 a 8,0. No entanto, o mecanismo pelo qual o pH atua na produção de enzimas pécnicas não é conhecido.

Autores como Baracat-Pereira et al. (1994), Brumano et al. (1993), Silva et al. (1993), Minussi et al. (1996), Brumano et al. (1993), Piccoli-Valle et al. (2001 a) e Piccoli-Valle et al. (2001 b) determinaram a atividade de pectina liase em fungos filamentosos; Sakiyama et al. (2001) determinaram a atividade de PL em bactérias endofíticas e todos esses autores determinaram a atividade de PL pelo método de Albersheim (1966).

Uma possível causa para a não detecção da enzima PL em meio líquido pode ter sido a baixa sensibilidade do método empregado neste trabalho. Nedjma et al. (2001) compararam os métodos de Nelson, usando cobre II e reagente de arseniomolibdato para detecção de atividade de PG e método colorimétrico usando ácido tiobarbitúrico (TBA) para detectar a atividade de PL. Observaram que nenhum desses métodos é conveniente para diferenciar essas duas atividades enzimáticas. Constataram que o teste colorimétrico TBA proposto por Cooper & Wood (1975) modificado e otimizado é mais seletivo e sensível para a detecção da atividade de PL. Segundo os autores, a aplicação desse método para a seleção de microrganismo confirma alta atividade de PL para *Aspergillus niger*, bem como atividade significativa de PL para levedura *Saccharomyces cerevisiae* SCPP (Nedjma et al., 2001). Os resultados obtidos demonstram a possível aplicação deste novo método para detectar atividade de PL sem interferência da atividade de PG.

4.5 Determinação de protease e proteína total

A atividade de protease foi determinada nos sobrenadantes das culturas de leveduras testadas para PL. A determinação da atividade de protease foi

realizada em meio líquido YW pH 7,0, sendo as leveduras cultivadas por 48h a 28°C. Os valores expressos na Tabela 6 representam a média de pelo menos 3 repetições. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 6. É possível que a existência de alguma protease, presente no meio de cultivo, esteja interferindo com a atividade da pectina liase. Protease extracelular pode ser importante para a levedura ter mais acesso a nutrientes nitrogenados e obter um equilíbrio com as fontes de carbono disponíveis (Abranches et al., 1997). A levedura 168 perdeu sua atividade enzimática proteolítica depois de armazenada em freezer por aproximadamente 5 meses. Outros autores também relataram a redução da atividade proteolítica em 80% em leveduras, após 6 meses sob refrigeração a - 20°C (Braga et al., 1998).

TABELA 6 Atividade proteolítica de leveduras cultivadas em meio líquido YW (pH7,0).

Código	Nome	Atividade proteolítica (U)^a
147	<i>Stephanoascus smithiae</i>	0,384 a
36	<i>Stephanoascus smithiae</i>	0,491 ab
FT-28	-	0,491 ab
SL-125	<i>Pichia anomala</i>	0,462 ab
185	<i>Zygoascus hellenicus</i>	0,569 b
FT-01	<i>Stephanoascus smithiae</i>	0,554 b
168	<i>Stephanoascus smithiae</i>	-

^aU= Aminoácidos livres/min/mL. Médias seguidas da mesma letra são iguais estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

A atividade de proteína total foi determinada no sobrenadante da cultura, em meio YW pH 7,0, sendo as leveduras cultivadas por 48h a 28°C. O método utilizado foi de Bradford (1976). Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 7. A produção total de proteína secretada também foi variada entre os isolados testados. A levedura *Zygoascus hellenicus* (185) secretou 42,55 µg de proteína/mL, o que explica a existência de proteína e que provavelmente o método para a detecção de PL não está sendo sensível.

TABELA 7 Proteína total secretada por leveduras isoladas de frutas tropicais.

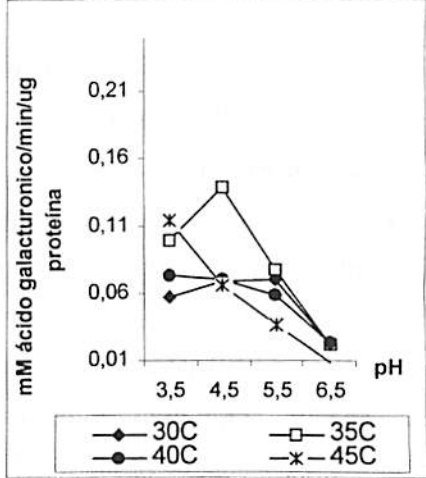
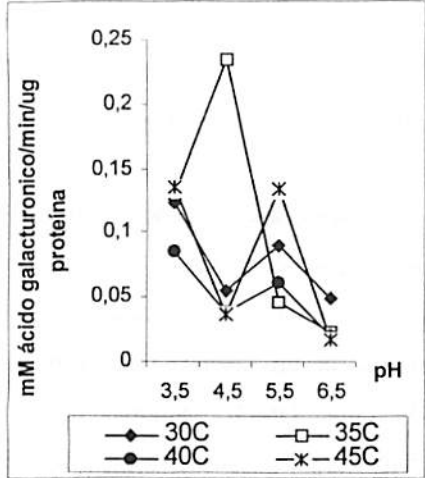
Código	Nome	Proteína total (U)*
147	<i>Stephanoascus smithiae</i>	23,85 a
36	<i>Stephanoascus smithiae</i>	19,92 a
FT-28	-	46,10 b
SL-125	<i>Pichia anomala</i>	18,16 a
185	<i>Zygoascus hellenicus</i>	42,55 b
FT-01	<i>Stephanoascus smithiae</i>	21,75 a
168	<i>Stephanoascus smithiae</i>	38,60 b

*U = µg de proteína/mL. Médias seguidas da mesma letra são iguais estatisticamente pelo teste de Tukey (5%).

4.6 Determinação das propriedades da enzima poligalacturonase (PG)

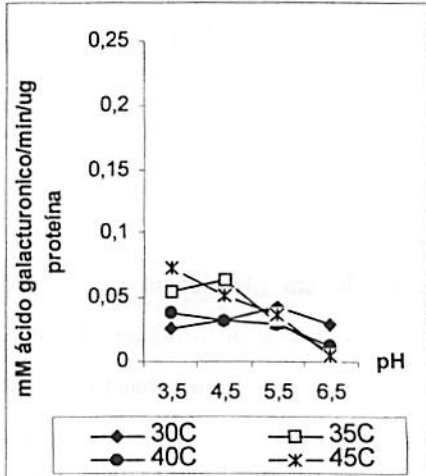
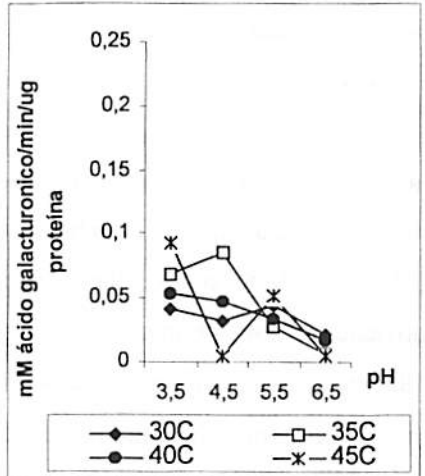
Os ensaios para a caracterização de PG das leveduras *Zygoascus helenicus* (185), 166 e *Kluyveromyces marxianus* CCT- 3172 foram realizados a partir da solução enzimática bruta obtida do cultivo das leveduras em meio YW pH 7,0 por 48h a 28 °C, com 0,5% de ácido poligalacturônico. As análises foram realizadas nas temperaturas de 30, 35, 40 e 45°C, sendo o substrato com variação de pH de 3,5; 4,5; 5,5 e 6,5 e os tempos de incubação da enzima de 15, 30, 45 e 60 minutos. Os dados obtidos em tempo de incubação de 15, 30, 45 e 60 minutos estão representados nas Figuras 7, 8 e 9, os desvios padrões estão em anexo B.

Na Figura 4 pode-se observar a variação da atividade da PG secretada pela levedura *Zygoascus helenicus* (185) em diferentes valores de pH, temperatura e tempo de incubação. Com 15 minutos de incubação do substrato com a PG secretada pela levedura *Z. helenicus* (185), observou-se que somente a temperatura de 35°C pareceu interferir com a atividade enzimática quando o valor de pH do substrato foi de 4,5. Nesta condição, a atividade enzimática foi de 0,235 mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína. As menores atividades foram obtidas em pH 6,5 a 35 e 40°C. Com 30 minutos de incubação, para a levedura *Z. helenicus* (185), a maior atividade da PG também foi detectada em pH 4,5 a 35°C, sendo de 0,140 mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína. As menores atividades foram obtidas em pH 6,5. Com 45 minutos de incubação, a levedura 185 apresentou maior atividade de PG em pH 3,5 a 45°C com 0,093 mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína em pH 6,5, a levedura 185 também apresentou as menores atividades. Em 60 minutos de incubação, a maior atividade detectada foi em pH 3,5 a 45°C, com 0,074 mM de ácido galacturônico/min/μg de proteína, e novamente foram observadas as menores atividades em pH 6,5. Pelos resultados obtidos, pode-se inferir que a PG secretada por *Z. helenicus* possui atividade variável em pH 4,5 e 5,5, nas temperaturas de 35 e 45°C



A

B

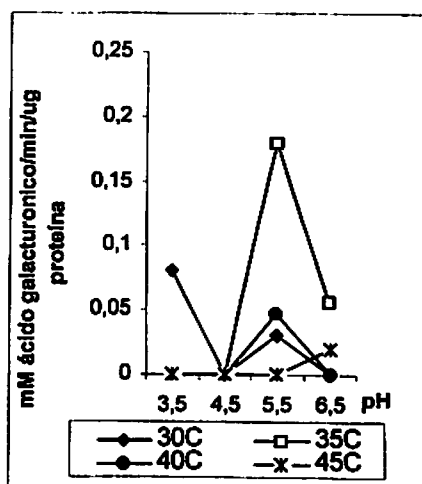
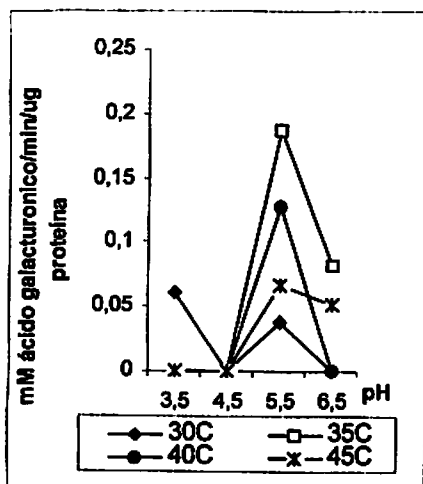


C

D

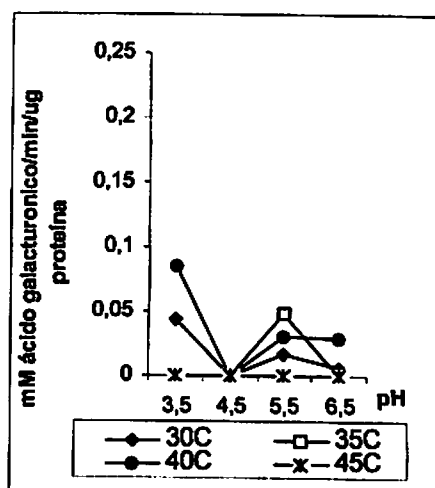
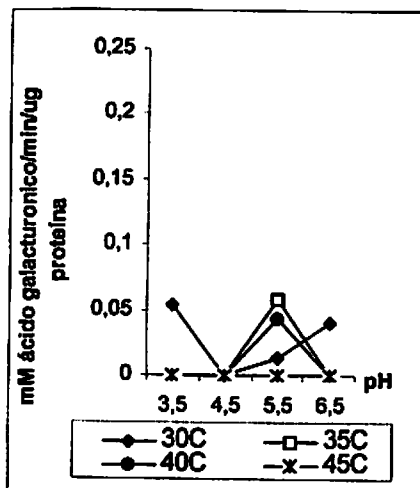
FIGURA 7 Atividade de PG para a levedura 185 em diferentes valores de pH, temperatura e tempos de incubação, A: 15 min., B: 30 min., C: 45min e D: 60 min.

Em 15 minutos de incubação (Figura 8) do substrato com PG secretada pela levedura 166, foi observada uma maior atividade de PG em pH 5,5 a 35°C, sendo de 0,187 mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína. Nesse tempo de incubação, a levedura 166 não apresentou nenhuma atividade em pH 4,5 e baixa atividade em pH 3,5 e 6,5. Entretanto, a 45°C em pH 6,5 houve um aumento na atividade nesse tempo de incubação. Em 30 minutos de incubação observou-se uma maior atividade da PG em pH 5,5 a 35°C de 0,179 mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína. Não houve atividade enzimática em pH 4,5 nesse tempo de incubação e também em pH 3,5 a 35 e 45°C, pH 5,5 a 45°C e pH 6,5 a 30°C e 40°C. Em 45 minutos de incubação, observou-se uma redução na atividade enzimática, sendo a maior atividade detectada também em pH 5,5 a 35°C de 0,058mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína. Não foi detectada nenhuma atividade enzimática a pH 4,5 nem a 45°C, em nenhum pH. Em 60 minutos de incubação, observa-se um decréscimo na atividade da enzima, exceto em pH 3,5 a 30°C, cuja atividade foi de 0,085 mM de ácido galacturônico/min/μg de proteína. Também nesse tempo de incubação não houve nenhuma atividade enzimática em pH 4,5 e a 45°C.



A

B

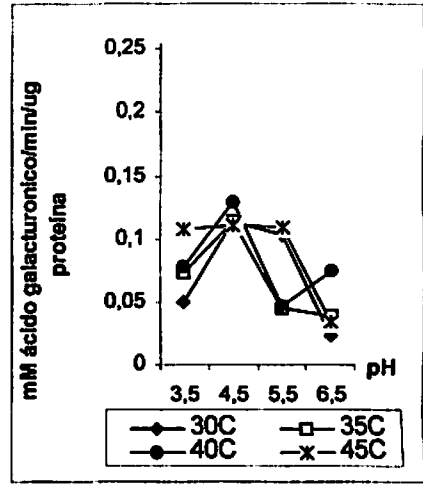
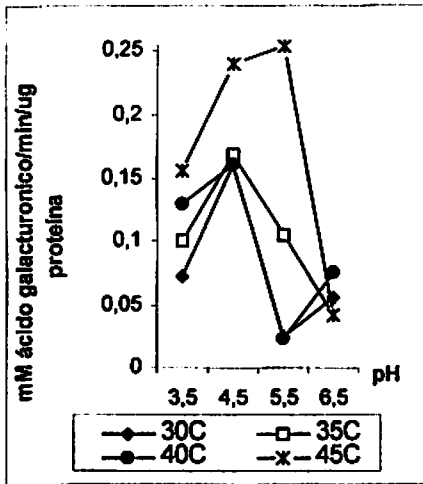


C

D

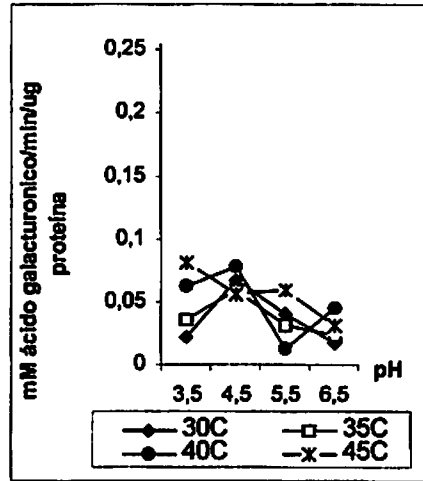
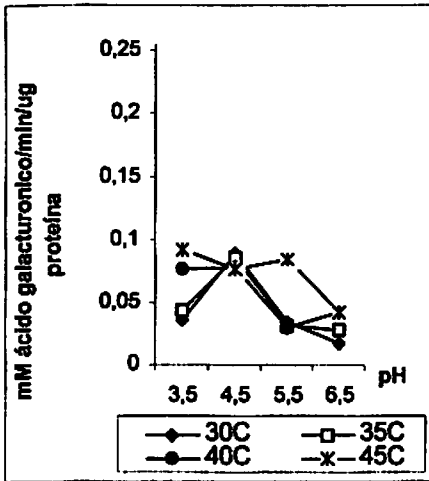
FIGURA 8 Atividade de poligalacturonase produzida pela levedura 166 em diferentes valores de pH, temperatura e tempos de incubação, A: 15 min., B:30min., C:45min. e D:60min.

Para a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT-3172 (Figura 9), observou-se que em 15 minutos de incubação do substrato pela PG secretada, a maior atividade foi a pH 4,5 a 45°C, sendo de 0,24mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína. As menores atividades foram em pH 5,5 a 30 e 40°C. Em 30 minutos de incubação, observou-se maior atividade de PG em pH 4,5 a 40°C de 0,129mM de ácido galacturônico/min/μg de proteína. A menor atividade foi em pH 6,5 a 30°C. À medida que aumentou o tempo de incubação enzima-substrato de 30 minutos para 60 minutos, houve uma diminuição na atividade da enzima em pH 5,5 e 6,5. Em 45 minutos de incubação do substrato, a maior atividade de PG foi encontrada a pH 3,5 em 45°C, de 0,092mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína. A menor atividade foi apresentada em pH 6,5 a 30°C. Em 60 minutos de incubação, a atividade enzimática diminuiu, sendo a maior atividade em pH 3,5 a 45°C de 0,081 mM de ácido galacturônico/min/μg de proteína e a menor atividade a pH 5,5 a 40°C de 0,013mM de ácido galacturônico/min/μg de proteína. Comparando os 4 tempos de incubação do substrato com a PG secretada pela levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT-3172, observou-se uma maior atividade enzimática nas amostras analisadas em pH 4,5, em todos os tempos de incubação.



A

B



C

D

FIGURA 9 Atividade de poligalacturonase secretada pela levedura CCT-3172 em diferentes valores de pH, temperatura e tempos de incubação, A: 15 min., B: 30min., C: 45min. e D: 60min.

Comparando a atividade da poligalacturonase das três melhores leveduras secretoras, *Zygoascus helenicus* (185), 166 e *Kluyveromyces marxianus* (CCT 3172), nos diferentes tempos de incubação, pode-se observar que em 15 minutos de incubação ocorreu maior atividade enzimática em valores de pH 4,5 a 35°C para levedura 185 (0,235mM de ácido galacturônico/min/μg de proteína); pH 5,5 a 35°C para levedura 166 (0,187mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína) e pH 5,5 a 45°C para levedura *Kluyveromyces marxianus* (CCT-3172) (0,253mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína) (Figuras 4, 5 e 6). Em 30 minutos de incubação, observou-se uma diminuição da atividade enzimática à medida que o valor de pH da mistura de reação foi elevado. Em 45 minutos de incubação, a atividade enzimática diminuiu, sendo a maior atividade de PG em pH 3,5 a 45°C para levedura 185 (0,093mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína); para CCT-3172 em pH 3,5 a 45°C (0,092mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína) e da levedura 166 a pH 5,5 em 35°C (0,058mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína).

No maior tempo de exposição da mistura enzima-substrato (60 minutos de incubação), foi observada uma maior atividade em pH 3,5 na temperatura de 45°C (0,073mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína para 185; 0,081mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína para CCT3172) e 0,085mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína em pH 3,5 a 40°C para a levedura 166. Nas temperaturas de 30 e 35°C, as maiores atividades de poligalacturonase obtidas foram em pH 4,5 (0,235mM de ácido galacturônico/min/μg de proteína para a levedura 185; 0,168mM ácido galacturônico/min/μg de proteína para *Kluyveromyces marxianus* (CCT3172), em pH 5,5 (0,092mM ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína para levedura *Zygoascus helenicus* (185), 0,109mM ácido galacturônico

liberado/min/ μ de proteína para levedura *Kluyveromyces marxianus* (CCT-3172) e 0,168mM ácido galacturônico/min/ μ g de proteína para levedura 166.

De modo geral, as maiores atividades de poligalacturonase por esse método de análise foram observadas em valores de pH 4,5 à temperatura de incubação de 35°C. Geralmente, endopoligalacturonases possuem atividade ótima a valores de pH 4,0 e 6,0 e a temperaturas entre 30 e 40°C (Sakai et al. 1993).

As menores atividades enzimáticas obtidas foram em pH 6,5 para as leveduras *Zygoascus helenicus* (185) e *Kluyveromyces marxianus* (CCT-3172). A baixa atividade pode ser atribuída à instabilidade da enzima nesse valor de pH. O pH influenciou diretamente a atividade enzimática pelas mudanças nas cargas nos aminoácidos, como aqueles situados no sítio ativo da enzima, influenciando na maior ou menor afinidade da enzima pelo substrato.

Dados obtidos por Schwan et al. (1997) para temperatura e pH ótimos de 40°C e 5,0, respectivamente, para PG de *K. marxianus* mostraram atividade de 0,02169 mM de ácido galacturônico/ μ g de proteína/min com 60 minutos de incubação. Blanco et al. (1994) relataram que poligalacturonase de *Saccharomyces cerevisiae* CECTI 389 apresentou atividade ótima a 45°C a pH 5,5.

Para a levedura 166, os dados obtidos, representados na Figura 8, indicaram uma maior atividade (0,168mM de ácido galacturônico liberado/min/ μ g de proteína) em pH 5,5 e temperatura de 35°C, com 30 minutos de incubação. Com 45 minutos de incubação da enzima, obteve-se uma maior atividade em pH 6,5 a 30°C, em 60 minutos, a maior atividade foi em pH 6,5 a 40°C.

A levedura controle (*K. marxianus* CCT-3172) em 30 minutos de incubação apresentou a melhor atividade em pH 4,5 a 40°C. Em 45 minutos de

incubação, o pH ótimo foi 3,5 e a temperatura, 45°C, em 60 minutos de incubação, o melhor pH também foi de 3,5 a 45°C.

As pectinases comerciais de origem fúngica geralmente contêm uma mistura de poligalacturonases, pectinoliases e pectinesterase, com pH ótimos de 4,5 e 5,0, semelhante ao pH natural de muitas frutas e derivados. Esta condição de atividade favorece a utilização e otimização do processo de extração ou de clarificação dos sucos, pois não existe a necessidade de correção do pH para a aplicação das enzimas (Chesson & Codner, 1978).

4.7 Determinação da atividade de PG nas amostras dialisadas.

A partir de um volume inicial de 500mL, ao final da concentração com PEG e diálise das amostras *Zygoascus helenicus* (185), 166 e *Kluyveromyces marxianus* (CCT-3172) restaram 25, 35 e 19 mL, sendo uma redução no volume de 95%, 93% e 96,2%, respectivamente.

A atividade de poligalacturonase foi determinada nessas amostras dialisadas, para verificar sua atividade.

Para a levedura *Zygoascus helenicus* (185), a atividade de PG foi determinada em pH 4,5 e 5,5 do substrato, à temperatura de 40°C, com 30 e 45 minutos de incubação, dados observados na Tabela 8, sendo esses os valores de pH e temperatura ótimos obtidos para a atividade dessa enzima para essa levedura. Para a levedura 166, determinou-se a atividade de PG em pH 6,5 a 40°C, em 60 minutos de incubação. Para a levedura *Kluyveromyces marxianus* (CCT-3172), a atividade de poligalacturonase foi determinada em pH 4,5 a 40°C em 30 e 45 minutos de incubação, dados mostrados na Tabela 8. O dado obtido antes da diálise foi de 0,071mM de ácido galacturônico liberado/min, verificou-se um aumento de 4,5 vezes na atividade da enzima.

TABELA 8 Atividade de PG em diferentes condições para as amostras dialisadas de 185, 166 e CCT-3172.

Levedura	Atividade de PG (U) [*] antes da diálise	Atividade de PG (U) [*] após a diálise	Aumento na atividade	pH	T (°C)	Tempo de incubação (min.)
185	0,052	0,84	16,0x	4,5	40	30
	0,044	0,46	10,5x	5,5	40	30
	0,025	0,19	7,60x	5,5	40	45
166	0,071	0,32	4,50x	6,5	40	60
CCT-3172	0,178	5,25	30,0x	4,5	40	30
	0,124	3,79	30,0x	4,5	40	45

* (U) = mM de ácido galacturônico liberado/min

4.8 Determinação da massa molecular aproximada (SDS-PAGE)

A separação eletroforética em condições desnaturantes foi realizada com as amostras *Zygoascus helenicus* (185), 166 e *Kluyveromyces marxianus* (CCT-3172), liofilizadas após a diálise. No perfil eletroforético, as bandas ficaram distorcidas, o que pode ser devido à acidez das amostras, não sendo possível identificar com nitidez nenhuma banda. Diante dessa limitação, a estratégia de precipitação de proteína com ácido tricloroacético foi alterada para precipitação com acetona a baixa temperatura (4°C).

As amostras liofilizadas foram ressuspensas em 300 μ L de água e centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos. O pellet foi descartado e foram adicionados 900 μ L de acetona gelada, ao sobrenadante, permanecendo em freezer por 24 horas. Após este tempo, a acetona foi descartada e adicionaram-se 30 μ L de tampão de amostra (apêndice) e o material foi aplicado no gel de eletroforese. Com esse método foram obtidas várias bandas no gel de eletroforese (Figura 10), mas a baixa resolução das mesmas não permitiu estimar a massa molecular aproximada da poligalacturonase. Para a determinação da massa molecular da poligalacturonase será necessária uma etapa de purificação a mais, como, por exemplo, a separação por cromatografia por filtração em gel.

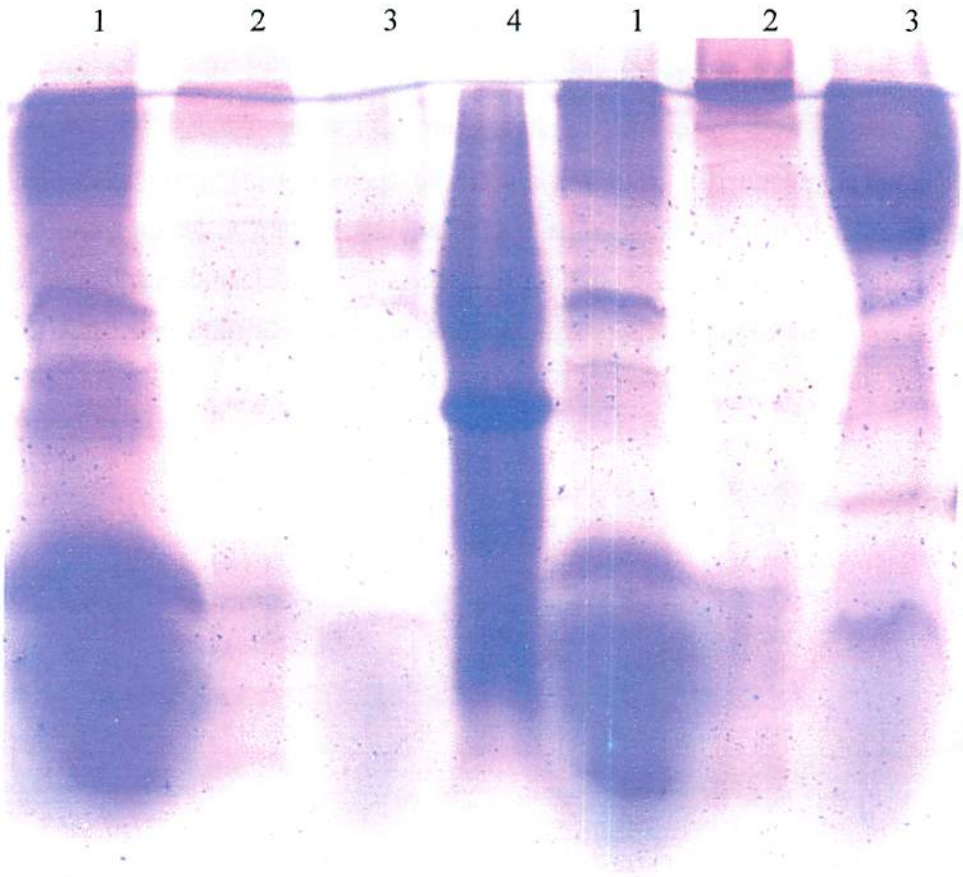


FIGURA 10 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS para sobrenadante de culturas liofilizada das leveduras. 1- 185; 2 - 166; 3 - CCT317 4 -Padrão Sigma C-3187 (45; 29; 20,1; 14,2; 6,5 kD)

4.9 Determinação do modo de ação da poligalacturonase

A determinação da atividade de poligalacturonase através da dosagem do açúcar redutor pode detectar tanto atividade de exo-PG quanto de endo-PG. Uma maneira de diferenciar o modo de ação foi realizada através da determinação da diminuição da viscosidade.

A exo-PG libera pequenos fragmentos da cadeia e não reduz significativamente a viscosidade (Grassin & Fauquemberg, 1996).

A endo-PG é caracterizada por uma forte redução na viscosidade (em geral 50%), resultado de uma baixa liberação de grupos redutores (1-3%). Para obter uma redução de 50% na viscosidade, uma exo-enzima tem que hidrolisar $\geq 20\%$ de ligações glicosídicas (Cooper et al., 1978). O tempo requerido para diminuir 50% na viscosidade de solução de 3,2% de ácido poligalacturônico foi de aproximadamente 28 minutos com sobrenadante da cultura de levedura, cultivada por 48h a 28°C em meio YW pH 7,0. Os resultados foram calculados de acordo com a fórmula abaixo (Cooper et al. 1975). Os melhores resultados obtidos no decréscimo da viscosidade foram para as leveduras *Debaryomyces hansenii* (SL-140), *Pichia anomala* (SL-125) e *Zygoascus helenicus* (185) (Figura 8). As unidades são expressas como unidade de viscosidade relativa (UVR), os dados estão representados na Tabela 9.

$$T_{50} = T_w + (T_{SE} - T_w)/2$$

T_{50} = tempo de fluxo representando 50% no decréscimo da viscosidade

T_w = tempo de fluxo da água

T_{SE} = tempo de fluxo do substrato + enzima (sobrenadante da cultura), no tempo zero.

Atividade da enzima (UVR) = 1000/min relativo a T_{50}

O decréscimo da viscosidade foi bastante variado entre as leveduras testadas, sendo observado (Tabela 9 e Figura 11) que a levedura *Debaryomyces hansenii* (SL-140) apresentou a maior redução (50%) na viscosidade em 10

TABELA 9 Dados de unidade de viscosidade relativa das leveduras em substrato contendo 3,2% de ácido poligalacturônico (UVR = unidade de viscosidade relativa)

Levedura	Nome	UVR
SL-140	<i>Debaryomyces hansenii</i>	5000,0
SL-125	<i>Pichia anomala</i>	100,0
185	<i>Zygoascus helenicus</i>	44,44
FT-35	<i>Candida intermedia</i>	33,33
36	<i>Stephanoascus smithiae</i>	11,11
FT-175	<i>Candida pseudoglaebosa</i>	11,11
CH-156A	<i>Pichia guilliermondii</i>	10,00
IC-54	<i>Stephanoascus smithiae</i>	7,14
162	<i>Pichia angusta</i>	7,14
FT-20	<i>Debaryomyces hansenii</i>	6,46
CH-146A	<i>Zygosaccharomyces cidri</i>	6,46
IC-38	<i>Pichia guilliermondii</i>	6,10
FT-01	<i>Stephanoascus smithiae</i>	5,13
166	-	5,00
53-CO	<i>Debaryomyces polymorphus</i>	4,40
CH-144A	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	3,80
147	<i>Stephanoascus smithiae</i>	3,50
IC-50	<i>Zygoascus helenicus</i>	0,095
FT-28	-	0
CH-142A	<i>Candida tenuis</i>	0
168	<i>Stephanoascus smithiae</i>	0

4.10 Determinação de pectina metilesterase (PE)

Nenhum resultado de atividade de pectina metilesterase foi obtidos no sobrenadante das culturas das 21 leveduras que secretaram poligalacturonase, o que pode ser uma característica favorável, pois o produto dessa enzima, o metanol, poderia dificultar a aceitação e aplicação dessas enzimas na indústria de sucos. Blanco et al. (1994) não detectaram atividade de pectina liase e nem pectina metilesterase em *Saccharomyces cerevisiae* CECT1389. Schwan et al. (1997) também não detectaram atividade de pectina metilesterase em filtrado de cultura de *Kluyveromyces marxianus*.

5 CONCLUSÕES

Das 300 leveduras isoladas, 21 foram positivas para poligalacturonase; dentre essas, 7 foram positivas para pectina liase e nenhuma foi positiva para pectina metilesterase.

Dentre as 21 leveduras positivas para poligalacturonase, foram identificadas os gêneros de *Stephanoascus* (5), *Candida* (4), *Debaryomyces* (3), *Pichia* (3), *Zygosaccharomyces* (2), *Zygoascus* (2) e duas possíveis novas espécies.

As leveduras *Zygoascus helenicus* (185) e 166 foram estatisticamente as melhores produtoras de poligalacturonase.

Não foi possível quantificar pectina liase nos isolados estudados.

Na caracterização parcial da enzima poligalacturonase da levedura selecionada *Zygoascus helenicus* (185), foi encontrado em pH 4,5, temperatura de incubação de 35°C, para uma atividade de 0,23mM de ácido galacturônico /min/μg de proteína. Para a levedura controle, *Kluyveromyces marxianus* (CCT-3172), foi observada uma atividade de 0,24 mM de ácido galacturônico/min/μg de proteína a pH 4,5 e 40°C.

Para endopoligalacturonase, a levedura *Debaryomyces hansenii* (SL-140) apresentou o melhor decréscimo na viscosidade, sendo de 5000 UVR, no entanto, sua atividade pela determinação espectrofotométrica de liberação de grupos redutores foi de 0,00061mM de ácido galacturônico liberado/min/μg de proteína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, J.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. The incidence of killer activity and extracellular protease in tropical yeast communities. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 43, n. 4, p. 328-336, Apr. 1997

AGUILAR, G.; HUITRON, C. Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus sp.* by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme and Microbial Technology*, Worburn, v. 9, n. 11, p. 690-695, Nov. 1987.

ALAHNA, A.; ALKORTA, I.; DOMINGUES, J. B.; LLAMA, M.J.; SERRA, J. L. Pectin Lyase Activity in a *Penicillium italicum* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 56, n. 12, p. 3755-3759, Dec. 1990.

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

AKIN, D. E.; FOULK, J. A.; DODD, R. B.; McALISTER III, D. D. Enzyme-retting of flax and characterization of processed fibers. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 89, n. 2/3, p. 193-203, Aug. 2001.

ALGHISI, P.; FAVARON, F. Pectin-degrading enzymes and plant-parasite interactions. *European Journal of Plant Pathology*, Dordrecht, v. 101, n. 4, p.365-375, July 1995.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, Oxford, v. 33, n. 1, p. 21-28, Jan. 1998.

ANTOV, M. G.; PERICIN, D. M. Production of by *Polyporus squamosus* in aqueous two-phase system. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, n. 4/5, v. 28, p. 467-472, Mar. 2001

BARACAT, M. C.; VALENTIM, C.; MUCHOVEJ, J. J.; SILVA, D. O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. *Biotechnology Letters*, London, v. 11, n. 12, p. 899-902, Dec. 1989.

BARACAT-PEREIRA, M.C.; COELHO, J. L. C.; SILVA, D. O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose and yeast extract for degumming of natural fibers. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 127-129, Mar. 1994.

BARNBY, F. M.; MORPETH, F. F.; PYLE, D. L. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification, and partial characterization of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v.12, n. 11, p. 891-897, Nov. 1990.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeast: characteristics and identification**. 3. ed. United Kingdom: Cambridge University Press, 2000. 1139 p.

BEHERE, A.; SATYANARAYAN, V.; DESAI, R. P. Separation and limited characterization of three polygalacturonases of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 15, n. 2, p. 158-161, Feb. 1993.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.18, n. 5, p. 355-385, Aug. 2000.

BLANCO, P.; SIEIRO, C.; DÍAZ, A ; VILLA, T. G. Production and partial characterization of na endopolygalacturonases from *Saccharomyces cerevisiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, n. 12, p. 974-977, Dec. 1994.

BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T. G. Production of enzymes in yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 175, n. 1, p. 1-9, June 1999.

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**, San Diego, CA, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BRAGA, A. A.; MORAIS, B. P.; LINARDI, V. R.; Screening of yeasts from Brazilian Amazon Rain Forest for Extracellular Proteinases Production. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 21, n. 3, p. 353-359, Aug. 1998.

BRÜHLMANN, F.; KIM, K. S.; ZIMMERMAN, W.; FIECHTER, A. Pectinolytic Enzymes from Actinomycetes for the Degumming of Ramie Bast

Fibers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 6, p. 2107-2112, June 1994.

BRUMANO, M. H. N.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F.; SILVA, D. O. Pectin Lyase Activity of *Penicillium griseoroseum* related to degumming of ramie. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 175-178, abr./jun. 1993.

CAO, J.; SUN, W.; PAN, Y.; CHEN, S. High-producers of Polygalacturonase Selected From Mutants Resistant to Rifampin in Alkalophilic *Bacillus* sp. NTT33. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 27, n. 4, p. 545-548, 2000.

CHESSON, A.; CODNER, R. C. The maceration of vegetable tissue by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 347-367 1978

CHRISTGAU, S.; KOFOD, L. V.; HALKIER, T.; ANDERSON, L. N.; DALBOGE, H.; KAMPPINEN, S. Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzyme. **Biochemistry Journal**, London, v. 319, n. 3, p. 705-712, Nov. 1996.

COLAGRANDE, O.; SILVA, A.; FUMI, D. Recent Applications of Biotechnology in Wine Production. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 10, n. 01, p. 2-17, Jan./Feb. 1994.

CONTERAS-ESQUIVEL, J. C. et al. Revisión: Extracción microbiológica y enzimática de pectina. **Archives Latinoamericanas de Nutricion**, Carracas, v. 47, n. 3, p. 208-215, 1997.

COOPER, R. M.; RANKIN, B.; WOOD, R. K. S. Cell wall-degrading enzymes of vascular wilt fungi. II- Properties and modes of action of polysaccharidases of *verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum f. splycopersici*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 13, n. 1, p. 101-137, 1978

COOPER, R. M.; WOOD, R. K. S. Regulation of synthesis of cell wall degrading enzyme by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 5, n. 2, p. 135-156, 1975.

DALBØGE, H. Expression Cloning of Fungal Enzyme Genes; a Novel Approach for Efficient Isolation of Enzyme Genes of Industrial Relevance. **FEMS microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 29-42, Aug. 1997

DEMIR, N.; ACAR, J.; SARIOGLU, K.; MUTLU, M. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part 3: Immobilized pectinase for mash treatment. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 275-280, Mar. 2001.

DEKKER, R. F. H. Enzyme in food and beverage processing. 2. **Food Australian**, Kensington, v. 46, n. 4, p. 179-181, Apr. 1994.

EVANS, J. D.; AKIN, D. E.; FOULK, J. A. Flax-retting by polygalacturonase-containing enzyme mixtures and effects on fiber properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 223-231, Aug. 2002.

FEDERECI, F. Production, purification and partial characterization of endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus var. albidus*. **Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, Dordrecht, v. 51, n. 2, p. 139-150, 1985.

FRAISSINET-TACHET, L.; FEVRE, M. Regulation by Galacturonic Acid of Pectinolytic Enzyme production by *Scelertinia sclerotiorum*. **Current Microbiology**, New York, v. 33, n. 1, p. 49-53, July 1996.

GAINVORS, A.; BELARBI, A. Pectinolytic activities from a strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast Genetics and Molecular Biology 1996** Madison, Wisconsin August 1996.

GAINVORS, A.; FREZIER, V.; LEMARESQUIER, H.; LEQUART, C.; AIGLE, M.; BELARBI, A.; Detection of polygalacturonase, pectin lyase and pectin-esterases activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, Sussex, v. 10, n. 10, p. 1311-1319, Oct. 1994.

GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KAPANTAI, M.; KALANTZI, O. Growth conditions of *Aspergillus sp.* ATHUM-3482 for polygalacturonase production. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v. 47, n. 4, p.145-148, Apr. 1993.

GARIBALDI, A.; BATEMAN, D. F. Pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi* and their effects on plant tissue. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 1, n. 1, p. 25-40, 1971

GODFREY, T.; WEST, S. I. Introduction to industrial enzymology, In: **Industrial enzymology** . Ed. Macmillan Press, 1996. p. 3.

GRASSIN, C.; FAUQUEMBERG, P. Fruit Juice. In: GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial enzymology**. 2. ed. New York: Stock Press, 1996. cap. 2.13, p. 227-260.

HADJ-TAIEB, N.; AYADI, M.; TRIGUI, S.; BOUABDALLAH, F.; GARGOURI, A. Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis* . **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 30, n. 5, p. 662-666, May 2002.

HANKIN, L.; LACY, G. H. Pectinolytic Microorganisms. In: SPECK, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 2. ed. Washington: American Public Health Association, 1984. chap. 15,

JIA, J. H. ; WHEALS, A. Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. **Currents Genetics**, New York, v. 38, n. 5, p. 264-270, Dec. 2000.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 215- 227, May 2001.


KILARA, A. Enzymes and their Uses in the Processed Apple Industry: A review. **Process Biochemistry**, Oxford, n. 4, p. 35-41, 1982.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 1984.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier, 1998.1055 p.

LACHANCE, M.; METCALF, B. J.; STARMER, W. T. Yeast from exudates of *Quercus*, *Ulmus*, *Populus*, and *Pseudotsuga*: new isolations of some factors affecting ecological specificity. **Microbial Ecology**, New York, v. 8, n. 2, p. 191-198, 1982.

LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970



LEE, B. H. **Fundamentals of food biotechnology**. Cambridge: Ed. VCH Publishers, 1996. chap. 6, p. 291.

LUH, B. S.; PHAFF, H. J. Studies on polygalacturonase of certain yeasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 48, n. 1, p. 23-37, Jan. 1951.

MANACHINI, P. L.; PARINI, C.; FORTINA, M. G. Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 10, n. 11, p. 682-685, Nov. 1988.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 37, n. 9, p. 949-954, Apr. 2002.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MINUSSI, R. C.; COELHO, J. L. C.; BARACAT-PEREIRA, M. C.; SILVA, D. O. Pectin lyase production by *penicillium griseoroseum*: effect of tea extract, caffeine, yeast extract, and pectin. **Biotechnology Letters**, London, v. 18, n. 11, p. 1283-1286, Nov. 1996.

MURUGESAN, G. S.; ANGAYARKANNI, J.; SWAMINATHAN, K. Effect of tea fungal enzymes on the quality of black tea. **Food Chemistry**, Oxford, n. 4, p. 1-4, Dec. 2002.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Production of pectinolytic enzymes – a review. **Bioprocess Engineering**, New York, v. 19, n. 5, p. 355-361, Nov. 1998.

NAGAI, M.; KATSURAGI, T.; TERASHITA, T.; YOSHIKAWA, K.; SAKAI, T. Purification and Characterization of an Endo-polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 64, n. 8, p. 1729-1732, Aug. 2000.

NEDJMA, M.; HOFFMAN, N.; BELARBI, A. Selective and sensitive detection of pectin lyase activity using a colorimetric test: application to the screening of microorganism possessing pectin lyase activity. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 291, n. 2, p. 290-296, Apr. 2001.

- PHAFF, H. J.; DEMAINE, A. L. The unienzymatic nature of yeast polygalacturonase. **Journal Biological Chemistry**, Bethesda, v. 218, n. 2, p. 875-884, 1956.
- PICCOLI-VALLE, R. H.; BRANDI, I. V.; SILVA, D. O.; PASSOS, F. J. V. Pectin Lyase production by *Penicillium griseoroseum* grown in sugar cane juice in repeated batch cultures. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 17, n. 5, p. 433-437, 2001a.
- PICCOLI-VALLE, R. H.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J. V.; SILVA, D. O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p.135-140, Apr./June 2001b
- RALET, M. C.; BONNIN, E.; THIBAUT, J. F. Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl-esterase. **Journal of Chromatography b**, Amsterdam, v. 753, n. 1, p. 157-166, Mar. 2001.
- REID, I.; RICARD, M. Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, n. 2/4, p. 115-123, Feb. 2000.
- RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 929-967, June 2001.
- RIED, J. L.; COLLMER, A. Comparison of Encimes Produced by *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* subsp *caratovora*, and *Erwinia caratovora* subsp. *Atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, n. 2, p. 305-310, Feb. 1986.
- ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Enzymes in Fruit and Vegetable Juice Technology. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 13, n. 8, p. 9-13, 1978
- SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 39, p. 213-294, 1993.
- SAKELLARIS, G.; NIKOLAROPOULOS, S.; EVANGELOPOULOS, A. E. Polygalacturonase biosynthesis by *Lactobacillus plantarum*: effect of cultural

conditions on enzyme production. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 397-404, Nov. 1988.

SAKIYAMA, C. C. H.; PAULA, E. M.; PEREIRA, P. C.; BORGES, A. C.; SILVA, D.O Characterization of pectin lyase produced by na endophytic strain isolated from coffe cherries. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 117-121, Aug. 2001

SANTOS, E. A.; OLIVEIRA, R. B.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Yeast associated with flowers and fruit from a semi-arid region of northeastern Brazil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 33-40, Jan./Mar. 996

SARIOGLU, K.; DEMIR, N.; ACAR, J.; MUTLU, M. The use of commercial pectinase in fruit juice industry, part2: Determination of the Kinetic behaviour of immobilized commercial pectinase. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 271-274, Mar. 2001.

SAWADA, K.; UEDA, M. Enzyme processing of textiles in reverse micellar solution. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 89, n. 2/3, p. 263-269, Aug. 2001.

SCHWAN, R. F.; COOPER, R. M.; WHEALS, A.E. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 21, n. 4, p. 234-244, Sept. 1997.

SCHWAN, R.F.; WHEALS,A.E.; Mixed microbial fermentations of chocolate and coffee. In. **Yeast in Food**. Hamburg, Germany: Behr's verlag, 2003. p. 429-449.

SCHWAN-RESENDE, R. F. **Pectinolytic Enzyme Production by cocoa-degrading Yeast: Production, Characterization and distribution of Polygalacturonase in wild type and Mutant *Kluyveromyces marxianus***. 1994. 208 p. Thesis (PhD) - Bath-England: University of Bath, Bath, England.

SHEVCHIK, V. E.; EVTUSHENKOV, A. N.; BABITSKAYA, H. V.; FOMICHEV, Y. K. Production of pectinolytic enzymes from *Erwinia* grown on different carbon sources. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 8, n. 2, p. 115-120, Mar. 1992.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbiol diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea*

arabica in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 2/3, p. 251-260, Sept. 2000.

SILVA, D. O.; ATTWOOD, M.M.; TEMPEST, D. W. Partial purification and properties of pectin lyase from *Penicillium expansum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 9, n. 5, p. 574-578, Sept. 1993

STEELE, D. B.; STOWERS, M. D. Techniques for Selection of Industrially Important Microorganisms. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 45, p. 89-106, 1991.

SOLIS, S.; FLORES, M. E.; HUÍTRON, C. Protoplast from pectinolytic fungi: isolation, regeneration and pectinolytic enzyme production. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 36-42, July 1996.

TACHET, L. F.; FEVRE, M. Regulation by galacturonic acid of pectinolytic enzyme production by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Current Microbiology**, New York, v. 33, n. 1, p. 49-53, July 1996.

TRINDADE, R. C.; RESENDE, M. A.; SILVA, C. M.; ROSA, C. A. Yeasts Associated with Fresh and Frozen Pulps of Brazilian Tropical Fruits. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 25, n. 2, p. 294-300, Aug. 2002.

VARGA, J.; KEVEI, F.; FEKETE, C.; COENEN, A.; KOZAKIEWICZ, Z.; CROFT, J. Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* aggregate. **Mycological Research**, New York, v. 97, n. 10, p. 1207-1212, Oct. 1993.

WHITAKER, J. R. Pectic substances, pectic enzyme and haze formation in fruit juice. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 6, n. 8, p. 341-349, 1984.

ANEXOS

ANEXO A		Página
Figura 1A	Curva padrão de proteínas totais.....	71
Figura 2A	Curva padrão de ácido galacturônico 1.....	71
Figura 3A	Curva padrão de ácido galacturônico 2.....	72
Figura 4A	Curva padrão do número de células.....	72
ANEXO B		
Tabela 1B	Desvio padrão em 15 minutos - 185.....	73
Tabela 2B	Desvio padrão em 30 minutos - 185.....	74
Tabela 3B	Desvio padrão em 45 minutos - 185.....	74
Tabela 4B	Desvio padrão em 60 minutos - 185.....	75
Tabela 5B	Desvio padrão em 15 minutos - 166.....	75
Tabela 6B	Desvio padrão em 30 minutos - 166.....	75
Tabela 7B	Desvio padrão em 45 minutos - 166.....	76
Tabela 8B	Desvio padrão em 60 minutos - 166	76
Tabela 9B	Desvio padrão em 15 minutos - CCT-3172	76
Tabela 10B	Desvio padrão em 30 minutos - CCT-3172	77
Tabela 11B	Desvio padrão em 45 minutos - CCT-3172	77
Tabela 12B	Desvio padrão em 60 minutos - CCT- 3172	78

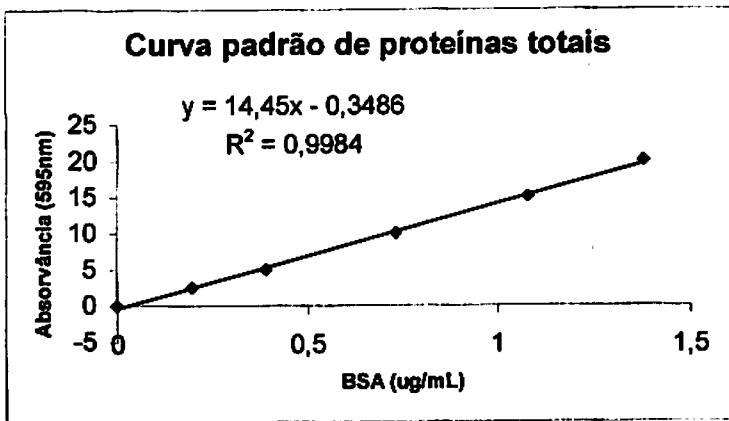


FIGURA 1 Curva padrão de albumina de soro bovino (BSA)

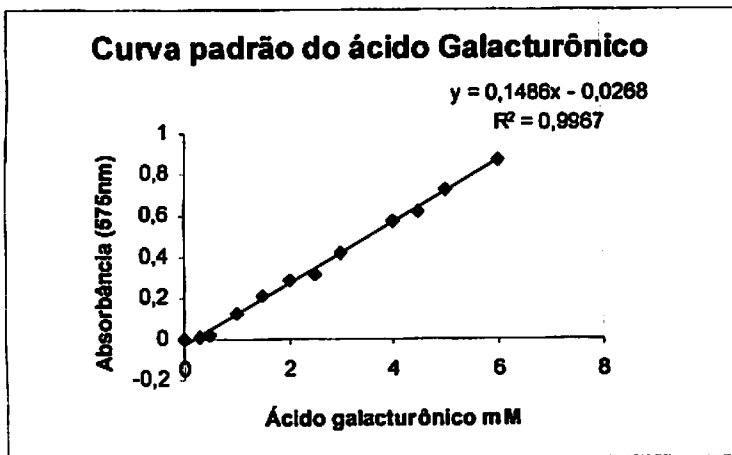


FIGURA 2 Curva padrão do ácido galacturônico (mM)

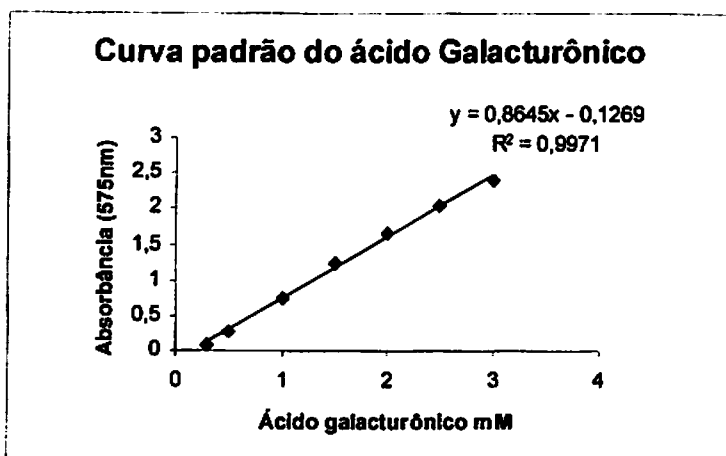


FIGURA 3 Curva padrão do ácido galacturônico (mM)

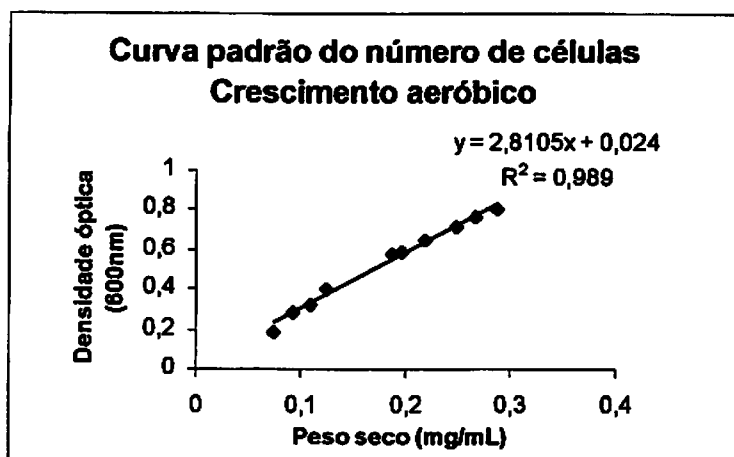


FIGURA 4 Curva padrão do número de células por peso seco (mg/mL)

TABELA 1 Desvio padrão em 15 minutos de incubação para a levedura 185 em diferentes valores de pH e temperatura.

PH	30°C	35°C	40°C	45°C
3,5	0,0109	0,0120	0,0121	0,0193
4,5	0,0030	0,0135	0,0236	0,0085
5,5	0,0040	0,0071	0,0136	0,0458
6,5	0,0066	0,0048	0,0030	0,0014

TABELA 2 Desvio padrão em 30 minutos de incubação para a levedura 185

PH	30°C	35°C	40°C	45°C
3,5	0,0038	0,0024	0,0013	0,0087
4,5	0,0007	0,0127	0,0046	0,0125
5,5	0,0058	0,0012	0,0223	0,0055
6,5	0,0074	0,0017	0,0059	0,0010

TABELA 3 Desvio padrão em 45 minutos de incubação para a levedura 185

PH	30°C	35°C	40°C	45°C
3,5	0,0021	0,0045	0,0054	0,0041
4,5	0,0033	0,0015	0,0015	0,0081
5,5	0,0048	0,0074	0,0087	0,0092
6,5	0,0045	0,0011	0,0001	0,00001

TABELA 4 Desvio padrão em 60 minutos de incubação para a levedura 185

PH	30°C	35°C	40°C	45°C
3,5	0,0012	0,0019	0,0038	0,0021
4,5	0,0015	0,0069	0,0067	0,0031
5,5	0,0054	0,0079	0,0011	0,0006
6,5	0,0023	0,0029	0,0025	0,0002

TABELA 5 Desvio padrão em 15 minutos de incubação para a levedura 166

PH	30°C	35°C	40°C	45°C
3,5	0,0195	0	0	0
4,5	0	0	0	0
5,5	0,0040	0,0268	0,0046	0,0233
6,5	0	0,0445	0	0,0157

TABELA 6 Desvio padrão em 30 minutos de incubação para a levedura 166

PH	30°C	35°C	40°C	45°C
3,5	0,0042	0	0	0
4,5	0	0	0	0
5,5	0	0,0426	0,0148	0
6,5	0	0	0,0025	0,0036

TABELA 7 Desvio padrão em 45 minutos de incubação para a levedura 166

PH	30°C	35°C	40°C	45°C
3,5	0	0	0	0
4,5	0	0	0	0
5,5	0,0038	0,0110	0,0070	0
6,5	0,0031	0	0	0

TABELA 8 Desvio padrão em 60 minutos de incubação para a levedura 166

PH	30°C	35°C	40°C	45°C
3,5	0,0024	0	0,0055	0
4,5	0	0	0	0
5,5	0,0050	0,0016	0,0036	0
6,5	0,0020	0	0,0066	0

TABELA 9 Desvio padrão em 15 minutos de incubação para a levedura CCT-3172

PH	30°C	35°C	40°C	45°C
3,5	0,0109	0,0120	0,0121	0,0193
4,5	0,0030	0,0135	0,0236	0,0085
5,5	0,0040	0,0071	0,0136	0,0458
6,5	0,0066	0,0048	0,0030	0,0014

TABELA 10 Desvio padrão em 30 minutos de incubação para a levedura CCT-3172

PH	30°C	35°C	40°C	45°C
3,5	0,0056	0,0018	0,0004	0,0142
4,5	0,0036	0,0055	0,0024	0,0042
5,5	0,0008	0,0018	0,0031	0,0056
6,5	0,0005	0,0006	0,0027	0,0036

TABELA 11 Desvio padrão em 45 minutos de incubação para a levedura CCT-3172

PH	30°C	35°C	40°C	45°C
3,5	0,0029	0,0037	0,0037	0,0063
4,5	0,0019	0,0001	0,0057	0,0043
5,5	0,0035	0,00009	0,0064	0,0009
6,5	0,0023	0,0034	0,0026	0,0002

TABELA 12 Desvio padrão em 60 minutos de incubação para a levedura CCT-3172

PH	30°C	35°C	40°C	45°C
3,5	0,0001	0,0024	0,0021	0,0059
4,5	0,0022	0,0039	0,0022	0,0012
5,5	0,0016	0,0001	0,0028	0,0022
6,5	0,0016	0,0009	0,0105	0,0014

APÊNDICE

Soluções para SDS - PAGE

Solução de coloração	
Coomassie Blue R250	0,5g
Metanol	800mL
Ácido acético	140mL
q.s.p.	2L
Solução descorante	
Metanol	800mL
Ácido acético	140mL
q.s.p.	2L
Solução secante	
Metanol	650mL
Glicerol	5mL
q.s.p.	1L
Solução fixadora	
Metanol	450mL
Ácido acético	100mL
q.s.p.	1L
Tampão de amostra	
SDS	4,6g
glicerol	20mL
Azul de bromofenol	200mg
2-β-mercaptoetanol	5%
Tris-HCl pH 6,8 (6,25mM)	200mL
Gel de acrilamida 12,5%	
H ₂ O	3,3mL
Acrilamida	4,15mL
Tris 1,5M	2,5mL
Persulfato de amônio 10%	50μL
Temed	8μL

Sobre gel 6%

H₂O

Acrilamida

Tris 0,5M

Persulfato de amônio

Temed

1,95mL

0,7μL

0,85μL

10μL

7,5μL