

**PECTINASES PRODUZIDAS PELO AGENTE  
BIOLÓGICO “G088”: EXTRAÇÃO E  
PURIFICAÇÃO**

**SABRINA CARVALHO**

**2007**

**SABRINA CARVALHO**

**PECTINASES PRODUZIDAS PELO AGENTE BIOLÓGICO “G088”:  
EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Química dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Carlos José Pimenta

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007

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

Carvalho, Sabrina

Pectinases produzidas pelo agente biológico G088: extração e purificação /  
Sabrina Carvalho. -- Lavras : UFLA, 2007.

100 p. : il.

Orientador: Carlos José Pimenta.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Pectinase. 2. Purificação. 3. Enzimas. I. Universidade Federal de Lavras. II.  
Título.

CDD-574.1925  
-664.25

**SABRINA CARVALHO**

**PECTINASES PRODUZIDAS PELO AGENTE BIOLÓGICO “G088”:  
EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Química dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2007

Profa. Dra. Sara Maria Chalfoun

UFLA

Profa. Dra. Maria Emília de S. Gomes Pimenta

UFLA

Prof. Dr. Carlos José Pimenta  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

## **OFEREÇO**

*Aos meus avós que sem medirem esforços, sempre estiveram presentes durante  
toda minha vida.*

*A minha querida avó e mãe Juraci, pela educação, pelas orações, pelo  
exemplo de mulher e mãe.*

*A Tia Eleusa pelo esforço, incentivo e amor.*

*Ao meu noivo Juliano, pela compreensão, amor e pelos momentos de  
descontração.*

*A todos meus familiares e amigos por terem acreditado na minha capacidade e  
contribuírem pela realização de mais esse sonho.*

## **DEDICO**

**A Deus, presença constante em minha vida, sempre me iluminando e  
abrindo novos caminhos. Obrigada Senhor por mais essa vitória.**

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Carlos José Pimenta pelos ensinamentos, amizade, orientação e principalmente por incentivar e confiar no meu crescimento pessoal e profissional durante o mestrado.

A Dra. Sara Maria Chalfoun pela disponibilidade, paciência e dedicação.

A Dra. Maria Emília de S. Gomes Pimenta pela atenção e exemplo profissional.

À Universidade Federal de Lavras por oferecer condições para a realização do mestrado.

A todos os professores do Departamento de Ciência dos Alimentos, pelas orientações e ensinamentos.

Ao órgão de pesquisa CNPQ, pelo incentivo e concessão da bolsa de estudos.

Aos amigos, em especial a Livia, que em tão pouco tempo tornou-se uma grande amiga, obrigada pela confiança, companheirismo e pelas gargalhadas que ficarão em nossas memórias.

Aos funcionários das secretarias do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela paciência e gentileza.

Aos funcionários responsáveis pela limpeza, pela organização e descontração nas horas vagas.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Alimentos do DCA/UFLA, pelos ensinamentos, paciência e auxílio durante as análises laboratoriais.

Ao pessoal da EPAMIG pela paciência e gentileza.

## **BIOGRAFIA**

Sabrina Carvalho, filha de Elci Carvalho e Aroldo Carvalho, nasceu em Lavras (MG) em 15 de março de 1982.

Em janeiro de 2000, ingressou na Universidade Federal de Alfenas, obtendo o título de Nutricionista em janeiro de 2005.

Em março de 2005, iniciou o curso de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, na Universidade Federal de Lavras, tendo concentrado seus estudos na área de Química de Alimentos e Enzimologia.

Em 28 de fevereiro de 2007, submeteu-se à defesa de dissertação para a obtenção do título de “Mestre”.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	i
GENERAL ABSTRACT .....	iii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Capítulo I: INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE PECTINASES PELO AGENTE BIOLÓGICO G088.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT .....	5
1 INTRODUÇÃO.....	6
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1 Substrato para a produção de pectinases por microorganismos: Substâncias pécticas .....	8
2.2 Enzimas pectinolíticas .....	11
2.3 Enzimas pectinolíticas e potencial industrial.....	13
2.4 Produção de enzimas pectinolíticas por fungos .....	20
2.5 Condições de cultivo.....	22
2.6 Fermentação em estado sólido .....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3.1 Microrganismo utilizado.....	31
3.2 Condições de Cultivo.....	32
3.3 Inóculo no meio de cultivo .....	33
3.4 Determinação da atividade da enzima poligalacturonase (PG) .....	34
3.5 Determinação da atividade da enzima pectinametilesterase (PME) .....	34
3.6 Delineamento experimental .....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Tempo de cultivo e produção de pectinases pelo G088.....	36
5 CONCLUSÃO .....	41



6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
Capítulo II: EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PECTINASES PRODUZIDAS PELO AGENTE BIOLÓGICO G 088 .....	49
RESUMO.....	50
ABSTRACT .....	52
1 INTRODUÇÃO .....	54
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	56
2.1 Extração e Solubilização Enzimática.....	57
2.2 Separação.....	60
2.3 Purificação final.....	63
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	68
3.1 Microrganismo utilizado e condições de cultivo .....	68
3.2 Determinação da atividade da enzima poligalacturonase (PG) .....	69
3.3 Determinação da atividade da enzima pectinametilesterase (PME) .....	69
3.4 Determinação do teor de proteínas totais e atividade enzimática específica.....	70
3.5 Extração enzimática.....	71
3.6 Separação enzimática ou precipitação .....	72
3.7 Cálculo do rendimento e índice de purificação.....	73
3.8 Delineamento experimental .....	74
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.1 Atividade enzimática do substrato inicial .....	76
4.2 Extração Enzimática .....	76
4.3 Precipitação enzimática .....	82
5 CONCLUSÕES .....	90
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	92
ANEXOS .....	97

## RESUMO GERAL

CARVALHO, Sabrina. **Pectinases produzidas por um agente biológico G088: extração e purificação.** 2007. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

As pectinases são responsáveis pela degradação de uma molécula complexa de pectina, estando presente em todos os tecidos vegetais jovens. A produção de pectinases em microorganismos é influenciada pelo tempo de cultivo e escolha de linhagens apropriadas. Considerando-se a crescente utilização de enzimas provenientes de microorganismos no mercado atual, diferentes procedimentos para isolamento e purificação estão sendo estudados. Este trabalho objetivou definir o tempo ideal de cultivo de um agente biológico para um melhor desenvolvimento e produção enzimática, além de purificar parcialmente as pectinases produzidas. Para tal, foi utilizado o arroz como fonte de carbono e energia, os quais são necessários ao crescimento microbiano como à produção de pectinases. A atividade de pectinametilesterase e poligalacturonase foi avaliada após o período de 10, 15 e 20 dias de inoculação do agente biológico no substrato, como também em cada etapa de purificação enzimática, segundo a metodologia de Jen & Robinson (1984) e Pressey & Avants (1973). A extração do complexo enzimático foi obtida por homogeneização em soluções tampão em diferentes pH (4, 5 e 6), seguida de centrifugação e precipitação com sulfato de amônio em diferentes concentrações (20,40 e 60%). De acordo com os resultados obtidos pode-se estimar que para se obter uma atividade ótima das enzimas em estudo, o agente biológico deve permanecer no substrato por 10 dias, apresentando uma média de atividade igual a 105,52 (U/g min) para poligalacturonase e 1480 (U/g min) para pectinametilesterase. Os resultados também evidenciaram que o tampão benzoato pH 4,0 apresentou melhores condições para a extração de ambas as enzimas em estudo. A enzima presente no extrato bruto foi então precipitada através de uma saturação com sulfato de amônio à 60%, com um rendimento final de 108,74% para PME e 10,55% para PG e com um índice de purificação de 14,24 e 1,39, respectivamente. Portanto conclui-se que até 10 dias de cultivo do agente biológico, tem-se uma produção enzimática crescente, após esse período inicia-se um declínio no crescimento fúngico, como também na sua atividade enzimática. A purificação parcial obtida foi bastante significativa, pois comparando-se os resultados obtidos com outros

---

\* Comitê de Orientação: Carlos José Pimenta - UFLA (Orientador); Sara Maria Chalfoun - UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – UFLA (co-orientadores).

processos de purificação enzimática, nota-se que o rendimento e índice de purificação, encontram-se dentro da média observada.

## GENERAL ABSTRACT

Carvalho, Sabrina. **Pectinases produced by the biological agent G088: extraction and purification.** 2007. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

The pectinases are responsible for the degradation of a complex molecule of pectina which are present in every young vegetable organ. The production of pectinases in microorganisms is influenced by the culture time and the appropriate choice of ancestry. Considering the current high use of enzymes from microorganisms nowadays, different procedures for isolating e purifying have been studied. This paper aimed at defining the ideal culture time of a biological agent for a better development and enzymatic production, and it also aimed at an efficient way of partly purifying the pectinases produced. For that purpose, it was used rice as the carbon source and energy, which are necessary to the microbiological growth as the production of pectinase. The activity of pectinametilsterase and poligalacturonase was evaluated after a period of 10, 15 and 20 days of inoculation from the biological agent in the substratum, as well as in each part of the enzymatic purification process, according to Jen and Robinson's (1984) methodology and Pressey and Avants (1973). The extraction of the enzymatic complex was got by homogenization in solutions drain plug with different ph (4, 5 and 6), followed by centrifugation and precipitation with ammonium sulphate in different concentrations (20, 40 and 60%). According to the results, we can estimate that in order to have a great activity of the studied enzymes, the biological agent must rest in substratum for 10 days, showing an activity average of 105,52 poligalacturonase for and 1480 (U/g min.) for pectinametilsterase. The results also showed that the benzoate drain plug pH 4,0 was in better condition for the extraction of both studied enzymes. The present enzyme in the rude extract was precipitated through a saturation with ammonium sulphate at 60%, with a final result at 108,74 for PME and 10,55% for PG and with a purifying rate at 14,24 and 1,39, respectively. So, we came to conclude that up to 10 days of culture of the biological agent, it got a rising enzymatic production, after this period it started to decline in growing biological agent, as well as in its enzymatic activity. The partial purification obtained was

---

\* Guidance Committee: Carlos José Pimenta - UFLA (Adviser); Sara Maria Chalfoun - UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – UFLA (co-advisers).

significant, because comparing the results with other processes we could see the results in the observed average.

## INTRODUÇÃO GERAL

Enzimas são de grande importância em processos industriais, em razão de sua especificidade e de seu potencial catalítico em inúmeras reações celulares. As enzimas microbianas são classes de proteínas responsáveis pela reciclagem de matérias orgânicas insolúveis na natureza. Dentre essas enzimas as pectinases apresentam um destaque no setor industrial.

Pectinases foram as primeiras enzimas a serem usadas na indústria. Sua aplicação comercial foi observada em 1930 para a preparação de vinhos e sucos de frutas. Porém, apenas em 1960, a composição química dos tecidos de plantas ficou esclarecida e com esse conhecimento, cientistas começaram a estudar e aplicar essas enzimas com maior eficiência. Como resultado, pectinases são hoje as enzimas que mais crescem no setor comercial, sendo produzidas principalmente por bactérias, fungos e leveduras.

Atualmente, a utilização de pectinases tem aumentado progressivamente, possuindo variadas aplicações industriais (indústrias têxtil, química, cosmética, farmacêutica), além de um destacado papel no setor alimentício, podendo influir na composição, processamento, deterioração e conservação dos alimentos. A produção comercial de pectinases para os mais diversos fins, tem sido um campo crescente da biotecnologia, cujo valor estimado de vendas tem aumentado progressivamente.

Sabe-se que grande parte das pectinases utilizadas comercialmente, são produzidas por microorganismos, principalmente por fungos. O agente biológico G088, em estudo, é considerado um bom produtor de pectinases, pois apresenta ampla distribuição geográfica, é facilmente cultivado em diferentes tipos de substrato, produz pectinases durante seu metabolismo, está presente de forma benéfica em diversos frutos que secam na planta, sendo que a sua ausência

levaria à produção de frutos colonizados por fungos prejudiciais à qualidade. Além disso, não é toxigênico ao homem, a exemplo dos fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, citados na literatura como amplamente utilizados para os mesmos fins.

Sabendo do grande destaque na utilização de pectinases no setor comercial e conhecendo o destaque do agente biológico G088 na produção dessas enzimas, o presente estudo objetivou conhecer o tempo ideal de cultivo do agente biológico G088 para uma máxima produção de pectinametilesterase e poligalacturonase, além de purificar as enzimas em estudo, com o intuito de aplicá-las, posteriormente, no processo de clarificação de sucos, validando assim seu potencial industrial.

## **CAPÍTULO I**

### **INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE PECTINASES PELO AGENTE BIOLÓGICO G088**



## RESUMO

CARVALHO, Sabrina. **Influência do tempo de cultivo na produção de pectinases pelo agente biológico G088**. 2007. Cap.I, p. 4-48. Dissertação – (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Pectinases podem ser sintetizadas por bactérias, fungos e leveduras. Atualmente a utilização de enzimas de origem fúngica tem aumentado progressivamente, apresentando grande destaque no setor industrial, principalmente no processamento de sucos de frutas e vinhos, tratamento de fibras têxteis e na fermentação do cacau e do café. A produção de pectinases em microorganismos é influenciada pelas condições de cultivo, em particular, do meio de cultura, tempo de cultivo e escolha de linhagens apropriadas. Quando esses critérios são alcançados, tem-se uma melhor produção enzimática. Este capítulo objetivou definir o tempo ideal de cultivo de um agente biológico para um melhor desenvolvimento e produção enzimática. Sendo utilizado o arroz como fonte de carbono e energia. Avaliou-se a atividade enzimática após o período de 20, 15 e 10 dias de inoculação do agente biológico no substrato. Para a determinação da atividade enzimática, utilizou-se o filtrado da cultura. A atividade de Poligalacturonase segundo o método descrito por Pressey & Avants (1973). Para a determinação de Pectinametilesterase, utilizou-se a metodologia de Jen & Robinson (1984). De acordo com os resultados obtidos pode-se estimar que para se obter uma atividade ótima das enzimas PME e PG, o agente biológico deve permanecer no substrato por 10 dias, apresentando uma média de atividade igual a 105,5244 (nmol/g) para Poligalacturonase e 1480 (nmol/g) para a enzima Pectinametilesterase. O agente biológico que foi cultivado durante 15 dias, também apresentou maior produção de pectinases, quando comparado ao período de 20 dias de incubação. Portanto conclui-se que até 10 dias de cultivo do agente biológico, tem-se uma produção enzimática crescente. Porém, após esse período de 10 dias inicia-se um declínio no crescimento fúngico, como também na sua atividade enzimática.

---

\*Comitê de Orientação: Carlos José Pimenta - UFLA (Orientador); Sara Maria Chalfoun - UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – UFLA (co-orientadores)

## ABSTRACT

Carvalho, Sabrina. **The influence of culture time over the production of pectinases by the biological agent G088**. 2007. Cap.1, p. 4-48. Dissertation (Master in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

Pectinase can be synthesized by bacterial source, fungus and leavening. Nowadays, the use of enzymes extracted by fungus has been increasing progressively, deserving special attention from industries, mainly at processing fruit juices and wines, at staple fibers treatment, and also at coffee and cacao fermentation. The production of pectinase in microorganisms is influenced by culture condition, in particular, by the time, the environment and the right choosing of appropriate ancestries. When these criteria are all reached, it is gotten a better enzymatic production. This chapter aimed at showing a definition of the ideal time (period) of culture for a biological agent to a better development and enzymatic production. During the process, it was used rice as a source of energy and carbon. The enzymatic activity was evaluated after a period of 20, 15 and 10 days of inoculating the biological agent in the substratum. For defining the enzymatic activity, it was used the filtered of the culture. The activity of the poligalacturonase, according the method described by Pressey and Avants (1973). For defining the pectinametilesterase, it was used the methodology of Jen and Robinson (1984). According to the results, it was possible to estimate that in order to get a great activity from the enzymes PME and PG, the biological agent must be in the substratum for ten days, showing an average of activity at 105.5244 (nmol/g) for poligalacturonase and 1480 (nmol/g) for pectinametilesterase. The biological agent was kept for 15 days, it also presented a higher production of pectinases, when comparing to the period of 20 days of incubation. Then, it was reliable to conclude that until 10 days of biological agent culture, it could increase the enzymatic production. So, after this period of 10 days, it begins the fungus decreasing period, as well as in its enzymatic activity.

---

\*Committee Guidance: Carlos José Pimenta - UFLA (Adviser); Sara Maria Chalfoun - UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – UFLA (co-advisers)

## 1 INTRODUÇÃO

As pectinases são responsáveis pela degradação de uma molécula complexa de pectina, que são polissacarídeos estruturais, presentes em todos os tecidos vegetais jovens. Atualmente as pectinases possuem várias aplicações biotecnológicas sendo consideradas um destaque no setor industrial. São necessárias na extração e clarificação de sucos de frutas e vinhos, extração de óleos essenciais, produção de alimentos para recém-nascido, fermentação do café e cacau, além do excelente destaque na indústria têxtil, especialmente no tratamento de fibras como o linho e o ramie (Malvessi & Silveira, 2004).

A produção de pectinases por microorganismos é influenciada pelas condições de cultivo, em particular do meio de cultura, tempo de cultivo e escolha de linhagens de microorganismo apropriadas. Quando esses critérios são alcançados, tem-se uma melhor produção enzimática.

Atualmente a escolha de novos microorganismos produtores enzimáticos é talvez o maior obstáculo na comercialização de novas enzimas. Entretanto, a otimização das condições de cultivo, aliada à escolha de linhagens de microorganismos apropriadas, podem levar a uma melhor produção enzimática, além de reduzir os custos de produção.

O agente biológico em estudo, denominado G088, é considerado um produtor enzimático em destaque, pois além de crescer rapidamente em vários substratos, inclusive resíduos industriais, também produz pectinases durante o seu metabolismo, sem a necessidade de suplementação de nutrientes ao meio de cultivo, e não causa danos à saúde do homem.

Sabendo-se dessa importância do agente biológico G088 na produção de pectinases, é necessário o conhecimento de aspectos relacionados à sua produção, para posterior aplicação biológica da enzima. Portanto, o presente

estudo objetivou definir o tempo ideal de cultivo do agente biológico G088 para um melhor desenvolvimento e produção enzimática de pectinametilesterase (PME) e poligalacturonase (PG). Essas linhagens foram cultivadas em meio de cultivo composto de arroz, para avaliação de seu potencial de produção de pectinases de acordo com o tempo de cultivo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Substrato para a produção de pectinases por microorganismos: Substâncias pécticas

O isolado do agente biológico G088 em estudo, tem como substrato indutor para a produção de pectinases as substâncias pécticas ou pectinas. Essas substâncias pécticas são polissacarídeos ácidos coloidais complexos, com uma cadeia principal composta de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligação  $\alpha$  1-4. Alguns açúcares neutros, tipicamente D-glucose, L-ramnose e L-arabinose e algumas vezes D-xilose e L-fucose, podem estar presentes formando as cadeias laterais da molécula (Kashyap et al., 2001; Rexová-Benková & Markovic, 1976). Os grupos carboxil do ácido galacturônico, são parcialmente esterificados por grupos metil e parcialmente ou completamente neutralizado por sódio, potássio e íons amônio (Gummadi & Panda, 2003).

As pectinas ou substâncias pécticas possuem alto peso molecular, sendo exclusivos de origem vegetal, presentes em todos os tecidos vegetais superiores, contribuindo para a firmeza e estrutura dos tecidos de plantas. São encontrados em quantidades variáveis, na lamela média e parede celular de todas as plantas superiores, não excedendo 1% do peso fresco. Sabendo-se que as substâncias pécticas são polissacarídeos estruturais para as células vegetais, sua degradação ou extração acarreta desintegração dos tecidos por separação celular, resultando num processo denominado maceração. Na natureza o processo de maceração é prejudicial, pois promove a deterioração dos frutos e outros órgãos das plantas (Bailey & Pessa, 1990).

De acordo com a proporção de grupos carboxílicos das cadeias poligalacturônicas esterificadas por grupamento metil-éster, com a presença de cadeias laterais glicosídicas e com a solubilidade, as substâncias pécticas são

classificadas em protopectina, ácido péctico, ácido pectínico e pectina (Sakai et al., 1993).

A *protopectina* é uma substância insolúvel em água, presente na parede celular dos vegetais, formada a partir da associação das cadeias laterais de molécula de pectina com proteínas, hemicelulose e celulose. Quando submetida à hidrólise restrita, a protopectina é convertida em ácido pectínico ou pectina (Yoshitake et al., 1994).

Os *ácidos pectínicos* e *pécticos* são constituídos principalmente por unidades de ácido galacturônico; os primeiros apresentam uma porção considerável dos radicais carboxílicos esterificados por grupamentos metil, ao passo que as carboxilas dos últimos são essencialmente livres de metila. Os sais derivados da neutralização desses ácidos por bases mono ou bivalentes são denominados pectinato e pectato (Sakai et al., 1993).

*Pectina* é um nome genérico para a mistura de diversas composições contendo ácido pectínico como principal componente, com graus variáveis de esterificação por grupos metil. A pectina em sua forma nativa é localizada na parede celular e pode ser entrelinhada com outros polissacarídeos e proteínas estruturais para formar protopectina insolúvel (Rexová-Benková & Markovic, 1976).

De acordo com Fischer & Bennett (1991), uma mesma molécula de pectina pode ser composta por regiões denominada lisas (smooth) e ramificadas (hairy). As regiões lisas são caracterizadas por um polímero linear de ácido galacturônico e seus ésteres metilados, unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4). As regiões ramificadas são heteropolímeros complexos, caracterizados pela alta concentração de cadeias laterais ligadas a um eixo galacturônico. Estas podem ser constituídas por arabinose, galactose ou glicose.

Dependendo da origem, as substâncias pécticas também podem se diferenciar quanto ao grau de esterificação metílica, a proporção de açúcares

neutros e ao grau de polimerização da molécula. Podem apresentar ainda um outro tipo de esterificação com ácido acético nos átomos de carbono 2 e 3 da unidade de ácido galacturônico, aumentando ainda mais a heterogeneidade desses compostos (Sakai et al., 1993).

Em uma fruta verde, a pectina está ligada a microfibrilas de celulose na parede da célula. Tal pectina é insolúvel e, portanto, confere rigidez à parede celular. No entanto, durante o amadurecimento a estrutura da pectina é alterada por enzimas que ocorrem naturalmente nas frutas. Estas alterações envolvem a quebra da cadeia da pectina ou de cadeias laterais anexadas às unidades que compõem a cadeia principal. Em qualquer um dos casos, o resultado é que a pectina se torna mais solúvel e sua força nas paredes celulares circunvizinhas é afrouxada e o tecido da planta é abrandado quanto à rigidez (Kashyap et al., 2001).

O esmagamento mecânico de frutas ricas em pectina produz um suco com grande viscosidade, pois a pectina permanece ligada à polpa na forma de uma massa gelatinosa. É difícil extrair este suco pressionando ou usando outros métodos mecânicos. Com a adição de pectinases, a viscosidade do suco da fruta diminui, a possibilidade de pressionar a polpa aumenta, a estrutura gelatinosa se desintegra e o suco é facilmente obtido e com maiores rendimentos (Alkorta et al., 1998).

O suco pressionado cru é rico em partículas insolúveis, que são principalmente compostas de substâncias pécticas. Estas partículas são conhecidas como “partículas nuvens”. Nestas partículas, um núcleo protéico com uma superfície de carga positiva é coberto por moléculas de pectina com carga negativa (Pilnik & Voragen, 1993). Esta carga negativa faz com que as moléculas de pectina se repilam umas às outras. As pectinases degradam esta pectina e expõem parte da proteína com carga positiva que estava abaixo, reduzindo, desta forma, a repulsão eletrostática que faz com que estas partículas

se agreguem a partículas maiores. Estas partículas maiores, conseqüentemente, se separam do resto. O que resulta é um suco transparente, mas, de forma alguma, claro. Uma segunda centrifugação e filtração subsequente, são necessárias para chegar ao suco claro que muitos consumidores preferem (Kashyap et al., 2001).

## **2.2 Enzimas pectinolíticas**

Em razão da grande diversidade de substâncias pécticas presentes em diferentes tecidos vegetais, existem várias enzimas capazes de degradar essas substâncias, que são denominadas enzimas pectinolíticas ou pectinases (Bailey & Pessa, 1990).

As pectinases são responsáveis pela degradação das substâncias pécticas para fins nutricionais e são produzidas principalmente por bactérias, fungos, leveduras e plantas superiores, não sendo sintetizadas por células animais, exceto por alguns insetos (Pardo et al., 1991).

A hidrólise da cadeia de pectina é obtida pela ação sinérgica de algumas enzimas, incluindo pectinametilesterase, endo e exo-poligalacturonase, pectato liase e pectina liase (Gummadi & Panda, 2003; Soares et al., 2001).

De acordo com Malvessi & Silveira (2004), devido à grande diversidade de pectinas presentes nos tecidos de plantas, as pectinases possuem diferentes mecanismos de ação sobre a estrutura poligalacturônica da molécula do substrato, podendo então ser classificada em dois grandes grupos, segundo seu mecanismo de ação: enzimas desesterificantes e despolimerizantes.

A enzima que cataliza a desesterificação das substâncias pécticas é denominada pectinametilesterase (PME), pectina metoxilase ou pectina desmetoxilase. Seu modo de ação consiste na remoção dos grupamentos metil-éster presentes em algumas substâncias pécticas, hidrolisando somente os



grupamentos adjacentes a grupos carboxílicos livres. Essas enzimas convertem a pectina em pectato e liberam metanol (Celestino et al., 2006).

Shen et al. (1999) caracterizando a enzima pectinametilesterase, relatam à importância dessa enzima na primeira separação da cadeia de pectina, pois a pectina de baixa metoxilação liberada pode ser hidrolizada pela poligalacturonase e pectato liase.

Em complemento às enzimas desesterificantes (pectinametilesterase), as despolimerases promovem a clivagem de ligações glicosídicas  $\alpha$ - (1,4) e são classificadas conforme 1- especificidade da enzima pelo substrato (pectina ou ácido péctico); 2- a posição de clivagem na cadeia principal das substâncias pécticas, atuação ao acaso (endo-enzima) ou a partir da extremidade redutora ou não redutora do substrato (exo-enzima); 3- o mecanismo de reação de despolimerização (clivagem por  $\beta$ -eliminação ou hidrólise do substrato) (Bailey & Pessa, 1990).

Dentre as enzimas despolimerizantes, as denominadas transeliminases ou liases catalisam a quebra não hidrolítica de pectatos, atuando na clivagem de ligações glicosídicas  $\alpha$ - (1,4) entre resíduos de ácido galacturônico adjacentes por  $\beta$ - eliminação e gerando duplas ligações entre os carbonos 4 e 5 do produto (Sakai et al., 1993). As liases são classificadas em pectina liase (PL) e pectato liase (PAL), de acordo com o substrato sobre o qual atuam.

Por outro lado, as despolimerases que atuam por hidrólise e tem como substrato o pectato são chamadas poligalacturonases. As poligalacturonases são hidrolases que catalizam a quebra da ligação glicosídica pela introdução de água, atuando mais em pectato que em pectina e resultam em mono e dissacarídeos (Pardo, C. et al., 1991). De acordo com o mecanismo das pectinases sobre molécula de substrato, estas podem ser classificadas em dois grupos: endopoligalacturonase que promovem a hidrólise ao acaso da cadeia de pectato,

e exopoligalacturonase, que hidrolizam a cadeia de pectato a partir da extremidade não redutora. A hidrólise do pectato ou de porções não esterificadas da cadeia de poligalacturonatos pela endopoligalacturonase produz uma série de oligogalacturonatos, podendo acumular mono, di e algumas vezes trigalacturonatos. Já a ação das exopoligalacturonases sobre a molécula de pectato provoca uma rápida liberação de grupos redutores (Rexová-Benková & Markovic, 1976).

### **2.3 Enzimas pectinolíticas e potencial industrial**

Alguns microorganismos, isolados de diferentes substratos estão sendo destacados por sua capacidade em degradar polissacarídeos presentes na biomassa, devido à produção de pectinases. O estudo das pectinases tem sido de grande importância, em razão da aplicação dessas enzimas em diferentes setores industriais (Alkorta et al., 1998).

Segundo Soares et al., (2001) dentre as enzimas microbianas despolimerizantes, as pectinases possuem grande destaque na indústria de alimentos. Essas enzimas atuam principalmente na extração, clarificação e despectinização de sucos de frutas.

Outras áreas de aplicação incluem a indústria de papel, polpa, extração de óleo, fabricação de alimentos para bebê, elaboração de ração animal e indústria têxtil. Na indústria têxtil, pectinases têm sido empregadas na maceração do linho e no tratamento de fibras têxteis brutas, como a juta e o rami. As pectinases também estão sendo utilizadas na indústria de fermentados, como por exemplo, na fermentação do café, do cacau e do fumo (Bacarat et al., 1989).

Na base de suas aplicações, as pectinases são, principalmente, de dois tipos: pectinases ácidas e pectinases alcalinas.

*Pectinases ácidas* são usadas nas indústrias de suco de frutas e na fabricação de vinho, normalmente vêm de fontes fúngicas. Os sucos produzidos por estas indústrias comercialmente incluem: (A) Sucos claros brilhantes (sucos de maçã, pêra e uva), (B) Sucos turvos (sucos cítricos, suco de ameixa, suco de tomate e néctares), e (C) produtos unicelulares nos quais a intenção é preservar a integridade das células da planta através de hidrólise seletiva dos polissacarídeos da lamela central. Os objetivos de se acrescentar enzimas diferem nestes três tipos de sucos de frutas e vegetais (Kashyap et al., 2001).

No caso dos sucos claros brilhantes, enzimas são acrescentadas com o objetivo de aumentar o rendimento do suco durante espremedura e filtração do suco, para remover matéria suspensa, chegando a um suco claro e brilhante (Ishii & Yokotsuka, 1972). Alguns exemplos de tais sucos e seus usos são descritos abaixo.

As pectinases são usadas na preparação do suco de *maçã* para facilitar a espremedura, ou extração do suco, e para auxiliar na separação de flóculos precipitados por sedimentação, filtração ou centrifugação. As vantagens do uso de pectinases no suco de maçã são as seguintes: sua eficácia permite com que o produtor diversifique o tipo de produtos, por exemplo: sucos escuros, claros, concentrados claros e aumente o valor do material cru. Na prática, o tempo total para a extração do suco é mais curto quando comparado ao processo clássico. As enzimas também ajudam na produção de sucos e concentrados mais estáveis e com um bom gosto, além de um reduzido desperdício de polpa, e menor preço de produção (maiores rendimentos, menos equipamento, menos trabalho num processo de concentração) (Pilnik & Voragen, 1993).

Além do suco de *maçã*, as enzimas pectinolíticas são também aplicadas em sucos de *uva e vinho*. Enzimas pecticas de fungos, normalmente *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, ou *Botrytis cinerea* são úteis na fabricação de vinho. Enzimas pecticas são usadas para reduzir escurecimento ou endurecimento do

suco de uva em qualquer dos três estágios: no primeiro estágio, enquanto as uvas estão sendo espremidas; no segundo estágio, que envolve o suco (suco líquido) antes da fermentação ou depois; ou no último estágio, já com a fermentação completada, quando o vinho está pronto para ser transferido ou engarrafado. A adição de pectinases no primeiro estágio é preferida, pois aumenta o volume do suco liberado e reduz o tempo de espremedura. Uma outra vantagem destas enzimas é a melhor liberação de antocianinas das uvas vermelhas ao suco na presença de enzimas pécticas. O tratamento enzimático do suco no segundo estágio, antes ou durante a fermentação, retira muitas partículas suspensas e freqüentemente alguns microorganismos indesejados. Finalmente, a adição de enzimas pécticas ao vinho fermentado no último estágio aumenta a taxa de filtração e claridade, mas o nível de enzima suplementado deve ser ajustado levando-se em conta o efeito inibidor do álcool nas pectinases (Pilnik & Voragen, 1993).

Além dos sucos claros citados acima, as pectinase também são empregadas nas etapas de produção dos sucos de *pêra*, *morango*, *framboesa* e *amora* (Grassin & Fauquembergue, 1996).

Enzimas pécticas contendo altos níveis de atividade de poligalacturonase, também são acrescentadas aos sucos de frutas para estabilizar o escurecimento de sucos cítricos, purês e néctares (turvos). Alguns exemplos são descritos abaixo:

A pectina da *laranja* é apenas parcialmente metilizada. Isto ocorre porque a laranja contém, naturalmente, grandes quantidades de pectinametilesterase, enzima que tira grupos metoxil de moléculas de pectina. Na presença de íons de cálcio, pectato insolúvel de cálcio é formado no suco da laranja, levando à precipitação indesejada de partículas escuras. No processo de extração do suco das laranjas, pectinases podem ser usadas em diferentes estágios, permitindo uma melhor extração de açúcares e sólidos solúveis,

resultando em maior rendimento e, portanto, viscosidade mais baixa. O tratamento enzimático aumenta a estabilidade de escurecimento. É muito importante usar pectinases com a atividade mais baixa de PME quanto for possível, para evitar a clarificação do líquido da polpa (Siliha & Pilnik, 1985).

As pectinases também estão envolvidas na recuperação de *óleos essenciais* localizados em células especiais nas frutas cítricas. Eles contêm hidrocarbonos (terpenos ou sesquiterpenos), compostos oxigenados (aldeídos, ésteres, álcoois, cetonas, fenóis) e resíduos não-voláteis (ceras, flavonóides, ácidos gordurosos). Após a extração do suco, as partículas da casca e a emulsão óleo-água são separadas. Enzimas podem melhorar o tempo do processo, o rendimento do óleo da emulsão e a qualidade do produto final, pois as enzimas destroem as propriedades emulsificantes das pectinas. Uma melhor separação da emulsão óleo-água necessita de pectinases e proteases. Através da hidrolização de complexos pectina-proteína, o óleo é lançado mais facilmente na fase aquosa (Kashyap et al., 2001).

A *manga* é processada como purê ou néctar, suco ou várias bebidas com misturas de sucos. Um néctar de manga típico apresenta 20-30% de purê. Enzimas exógenas são usadas para aumentar a concentração do purê de manga ou para produzir suco claro e concentrado. Pectinases, hemicelulases e celulases possuem atividades importantes usadas para degradar a polpa da manga. Tratamento enzimático da massa da manga produz um rendimento de cerca de 80% do suco de manga total presente na fruta (Kashyap et al., 2001).

O néctar do *damasco* apresenta um fenômeno de perda de escurecimento que pode ser evitado moendo-se a polpa bem sutilmente, além disso, a adição de enzimas pectinolíticas separadamente, ou em combinação com homogeneização, leva a um néctar de damasco de escurecimento estável, uma vez que apenas a homogeneização não chega a alcançar esta estabilidade (Siliha & Pilnik, 1985).

A *banana* é largamente apreciada pelo seu sabor e aroma, tanto como suco de banana quanto na mistura com outros sucos. No entanto, o suco da banana é polposo demais e muito viscoso para render bebidas facilmente. A polpa almejada é então macerada usando-se enzimas pécnicas, pressionada, e o suco é clarificado ou centrifugado antes da concentração. O tratamento enzimático gera uma viscosidade reduzida, alto rendimento e concentração dos sucos de banana (Kashyap et al., 2001).

Além do emprego de pectinases nos tratamentos de sucos claros e escuros, elas também estão sendo extensamente utilizadas em *produtos unicelulares*. Produtos unicelulares são aqueles formados pela transformação de tecidos organizados em uma suspensão de células intactas, resultando em produtos que podem ser usados como material base para sucos polposos e néctares, como alimento para bebê, como ingredientes para produtos de laticínio como iogurte, e como protoplastos para várias aplicações biotecnológicas. As enzimas usadas para este propósito são conhecidas como “macerases” e este processo é conhecido como maceração. É provável que a melhor preparação enzimática para maceração contenha celulasas, hemicelulasas e enzimas pécnicas (Alkorta et al., 1998).

*Pectinases alcalinas* são utilizadas, principalmente, no descolamento e maceramento de safras de fibras e no pré-tratamento de água eliminada da indústria de sucos de frutas. Estas enzimas vêm, majoritariamente, de fontes bacterianas (Kashyap et al., 2001). No setor industrial, pectinases alcalinas, são muito aplicadas.

Pectinases estão envolvidas no maceramento e desengomagem de juta, linho, cânhamo, rami e fibra da casca do coco. Maceramento é um processo de fermentação no qual certas bactérias (por exemplo, *Clostridium*, *Bacillus*) e certos fungos (por exemplo, *Aspergillus*, *Penicillium*) decompõem a pectina da casca e liberam fibra. Durante o maceramento da água do linho, a separação da

fibra é causada por uma pectinase. O processo de degomagem, isto é, a retirada de substâncias pécnicas da parede das células vegetais do caule, com a liberação das fibras celulósicas, é extensamente aplicado às fibras do linho (Geocze, 1994). O processo de maceração biológica, como tratamento prévio à degomagem química pode ser aplicado às fibras do rami com a finalidade de tornar esta operação mais fácil e rápida, com economia de produtos químicos e energia, além de minimizar a descarga de poluentes no ambiente (Bacarat et al., 1989). Fibras rami são um excelente material têxtil natural, porém possuem de 20 à 35% de “borracha de rami” que consistem, principalmente, de pectina e hemicelulose, sendo necessário descolar as fibras para atingir as necessidades para materiais têxteis. O descolamento com enzimas microbianas (pectinases) é um meio provável de resolver este problema. Enzimas pectinolíticas mostraram bons efeitos de descolamento, resultando em uma boa separação da fibra (Cao et al., 1992).

A água eliminada pela indústria de processamento cítrico contém materiais pectináceos. Para o tratamento da água eliminada das indústrias de processamento cítrico vários processos foram investigados, incluindo: drenagem física, irrigação por pulverização, coagulação química, tratamento da lama ativado diretamente e hidrólise química, seguida de fermentação do metano. Estes processos possuem algumas barreiras, como baixa eficiência devido à resistência química das substâncias pécnicas, alto custo e longo período de tratamento, além da complexidade do processo. No entanto, pré-tratamento indireto por enzima pectinolítica produzida por bactérias e fungos foi suficiente para solubilizar quase todas as substâncias pécnicas contidas na água eliminada (Kashyap et al., 2001).

Fábricas de polpa e papel estão começando a usar enzimas para solucionar problemas em seus processos de manufatura. A fabricação de papel é, essencialmente um processo de filtração contínua no qual uma suspensão diluída

de fibras, fragmentos de fibras (finos) e partículas inorgânicas (argila) são transformados em folhas. As enzimas pectinolíticas podem contribuir durante as etapas de filtração solubilizando polissacarídeos (pectinas) que são substâncias que interferem de forma inoportuna durante a filtração e obtenção de papel (Carr, 1985).

Os óleos de 'rape seed' (Canola), semente de coco, semente de girassol, palmeira, amêndoa e olivas são, tradicionalmente, produzidos por extração com solventes orgânicos, porém o solvente mais comumente usado é o hexano que apresenta propriedades carcinogênicas. Atualmente, enzimas que degradam a parede celular, incluindo pectinase, podem ser usadas para extrair óleo vegetal em um processo aquoso, por liquefação dos componentes estruturais da parede celular do vegetal que contêm o óleo. Esse preparo de enzimas que degradam a parede celular começou a ser usado no preparo de óleo de oliva. As enzimas são adicionadas durante a moagem das olivas, e, dessa maneira, o óleo é facilmente liberado nas técnicas de separação subseqüentes. O tratamento com pectinase, causa, portanto, um aumento no rendimento do óleo de oliva, facilita a extração do óleo, melhora sua estabilidade quando armazenado, além de apresentar maior conteúdo de polifenóis e vitamina E, estabilizando o óleo contra o ranço (Kashyap et al., 2001).

As pectinases têm um importante papel na fermentação de chá e café. A fermentação de café com o uso de microorganismos pectinolíticos é feita para remover a camada de mucilagem dos grãos do café. As pectinases são, às vezes, adicionadas para remover a camada mucilaginosa do grão, dos quais  $\frac{3}{4}$  consistem em substâncias pécticas. Celulases e hemicelulases presentes no preparo enzimático ajudam a digestão da mucilagem. O estágio de fermentação do processamento do café é acelerado e reduzido de 40 a 80 horas para 20 horas por tratamento enzimático. Pectinases fúngicas são também utilizadas na manufatura do chá. Tratamento enzimático acelera a fermentação do chá, além



de melhorar a propriedade de formação de espuma dos pós para chá instantâneo, por destruir as pectinas do chá (Carr, 1985).

#### **2.4 Produção de enzimas pectinolíticas por fungos**

As pectinases são produzidas principalmente por fungos filamentosos, leveduras e bactérias. A composição dos complexos enzimáticos pectinolíticos varia entre as espécies de microorganismos. Portanto a seleção de isolados capazes de sintetizar enzimas adequadas é um processo fundamental para o uso industrial (El-Refai et al., 1984; Ueda et al., 1982).

Nos últimos anos bactérias, leveduras e outros fungos despertaram grande interesse de estudo, em virtude das inúmeras vantagens apresentadas, destacando-se, dentre elas as seguintes:

- não necessitam de amplos espaços para seu crescimento e não dependem das condições atmosféricas (Falanghe, 1975; Ursini, 1974);
- os fatores de crescimento como concentração de nutrientes, pH, temperatura, concentração de oxigênio e de células podem ser manipulados facilmente (Snyder, 1970);
- conseguem degradar e crescer em amplos substratos, inclusive em resíduos industriais, que podem ser aproveitados desde que se escolha o microorganismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada. Como decorrência desse fato, tem-se a redução ou o controle dos problemas de poluição causados por esses resíduos (Falanghe, 1975);
- possuem um crescimento rápido quando as condições de crescimento são favoráveis. A população de fungos chega a dobrar em intervalos de 4 a 12 horas, as leveduras de 1 a 3 horas e as bactérias de 0,5 a 2 horas (Falanghe, 1975; Snyder, 1970);

- podem ser manipulados geneticamente para obtenção de mutantes desejados (Batt & Sinskey, 1989).

Os fungos, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma grande variedade de substratos, sendo excelentes decompositores de material orgânico. Além disso, as pectinases produzidas por fungos apresentam características importantes para a aplicação em bioprocessos, como estabilidade ao pH e à temperatura (Martin et al., 2004).

Um outro fator que pode justificar a crescente utilização de enzimas fúngicas na indústria de alimentos, é o fato dos fungos produtores de pectinases possuírem o pH de atuação bem próximo ao pH da maioria dos sucos de frutas, o qual varia de 3,0 a 5,5 (Moyo et al., 2003).

Preparações comerciais de pectinases são normalmente de origem fúngicas, especialmente, de *Aspergillus* e *Penicillium*, que exibem características de alta atividade de endopoligalacturonase e de pectinaliase. Estas preparações de pectinases disponíveis no mercado são compostas por pectinametilesterase, poligalacturonase e pectina liase. Além do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, outros fungos filamentosos produtores de pectinases são citados por Geocze (1994) e Castilho (1999), como: *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Monilia*, *Coniothyrium* e *Rhizopus* dentre vários outros que vêm sendo avaliados como potentes produtores de pectinases. Apesar da propriedade desses fungos quanto à produção de pectinases, nem todos são aproveitáveis, já que alguns deles são produtores de várias micotoxinas, que podem ser prejudiciais à saúde do homem (Dalboge, 1997)

Apesar de existirem vários fungos produtores de pectinases, Jia & Wheals (2000), afirmam que as enzimas pectinolíticas usadas na indústria de alimentos são comercialmente produzidas em sua maioria por *Aspergillus niger*. Esta espécie de fungo produz várias pectinases, incluindo pectinametilesterase (PME), poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL). As pectinases produzidas

por *Aspergillus niger* são de grande importância, pois são classificadas como GRAS, permitindo assim sua aceitabilidade na indústria de processamento de alimentos. Além disso, a pectina liase produzida por *Aspergillus niger* é a única enzima capaz de hidrolizar, sem ação prévia de outras enzimas, pectinas altamente esterificadas, como a pectina de frutas.

Dalboge, (1997) menciona que, apesar da extensa aplicação de pectinases de *Aspergillus niger* no setor comercial, muitas apresentam baixa atividade de PG e alta atividade de PME e PL. Além disso, o uso da mistura enzimática produzida por *Aspergillus*, pode resultar em decréscimo da estabilidade do suco de fruta pela precipitação dos derivados de pectina desesterificado com íons de cálcio presente no suco e liberação de metanol para o sistema digestivo. O que segundo Dalboge (1997), pode inviabilizar a aplicação dessas enzimas na indústria alimentícia. Atualmente novos estudos estão sendo incentivados, buscando o conhecimento e aplicação de pectinases obtidos de outros fungos no setor comercial.

## **2.5 Condições de cultivo**

A produção de pectinases em microorganismos é influenciada pelas condições de cultivo, em particular, composição do meio de cultura, tipo e concentração da fonte de carbono, período de incubação, estágio do ciclo de crescimento, pH e temperatura de cultivo, além de outros fatores (Bravo et al., 2000).

O pH é considerado um importante parâmetro envolvido na produção e manutenção de pectinases, pois alterações nos valores de pH podem influenciar a atividade enzimática por meio de modificações conformacionais na molécula, proporcionando assim alterações no seu sítio ativo, resultando na redução ou no aumento da sua afinidade com o substrato (Garzón & Hours, 1992). Geocze (1994) também sugere que uma das razões pela qual a produção e atividade de

enzimas pécticas variam com o pH, também está relacionada com a estabilidade do pH de cada enzima péctica.

Fidurek et al. (1989), utilizando *Aspergillus niger*, detectaram pectinases após 12 horas de cultivo, ocorrendo aumento progressivo nessa produção com o passar do tempo, sendo o valor ideal de pH para a produção de pectinases por *Aspergillus niger*, neste estudo, igual a 6,0. Por outro lado, Bracat et al. (1991) trabalhando com *Aspergillus formigatus*, determinaram que a atividade máxima de poligalacturonase ocorre em pH 3,1.

Ueda et al. (1982) mostraram que variações no pH do meio de cultura provocaram alterações no tipo, na quantidade e no tempo de produção das PME, PG e PL de *Aspergillus oryzae* A3. Esses autores determinaram que a produção de PG foi maior em meio com pH 4,0 quando comparada a meios com pH 6,0. Esses autores sugeriram que uma das razões pela qual as atividades de PME, PG e PL variam com o pH do meio de cultura, seria a estabilidade de cada enzima ao pH. Vários outros autores verificaram que a maior produção de poligalacturonase ocorre em pH ácido, geralmente em torno de 3,0-4,0 (Aguilar et al., 1991; Martins et al., 2002).

De acordo com Pandey (2003), nos processos de fermentação em meio sólido (SSF), a acidificação do meio tem influenciado a produção de pectinases. Siessere (1991) verificou que os maiores níveis de atividade pectinolítica para *Penicillium frequentans* foram obtidos quando o pH do meio de reação estava entre 4,0 e 5,4, diminuindo acentuadamente em valores de pH mais elevados e atingindo em pH 6,0 e 7,0, respectivamente, 33 e 8% da atividade ótima observada em pH=5,0. Os valores de pH ótimo de reação estão incluídos no intervalo de pH encontrado para outros fungos, que geralmente varia de 3,8 a 5,5 (Bailey & Pessa, 1990). A maioria dos trabalhos mostram que as enzimas pectinolíticas purificadas são inativas em pH alcalino (Siessere, 1991).

Como o pH, a temperatura também tem seu papel de destaque, uma vez que afeta a viabilidade e o crescimento microbiano, o número de microorganismos no final do processo, a composição química e enzimática das células, como também suas necessidades nutricionais (Olson & Nottingham, 1980).

Todo microorganismo possui uma temperatura ótima de crescimento, pois quando se eleva a mesma até esse ponto, ocorrerá nas células um aumento das reações químico-enzimáticas e conseqüentemente, o crescimento celular torna-se mais rápido. Porém se o aumento persistir e ultrapassar a temperatura máxima suportada pelos microorganismos ocorrerá a morte dos mesmos, que será mais evidente quanto maior for o tempo de exposição a essa temperatura. Por outro lado, a medida que a temperatura decresce afastando-se do ponto ótimo, o crescimento celular torna-se cada vez mais lento, até chegar o momento onde cessará. Nesse ponto pode-se dizer que se está abaixo da temperatura mínima suportada pelo microorganismo (Loudiere et al., 1987).

Siessere (1991) estudando o efeito da temperatura sobre o crescimento e produção enzimática de *Penicillium frequentans*, constatou que nas temperaturas de 30 a 35°C, ocorreu a maior produção de enzimas pectinolíticas. Ao contrário do que foi verificado para *Penicillium frequentans*, a produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* não foi afetada pela temperatura entre os valores de 25 e 40°C, mas a produção de pectinase foi maior a 30°C.

O comportamento diferente da produção de biomassa e atividade pectinolítica, frente à temperatura de cultivo foi citada também para os fungos *Cryphonectria parasítica*, *Venturia inaequalis*, *Aureobasidium pullulans* e *Botrytis cinérea*, os quais apresentaram temperatura ótima para o crescimento entre 40 e 50°C. Porém a poligalacturonase do fungo *Penicillium expansum*, do sobrenadante da cultura, foi estável em temperaturas abaixo de 40°C quando pré-incubada por 1 hora em temperaturas entre 20° e 80°C (Freitas, 1991).

Siessere (1991) ressalta que o extrato bruto enzimático é mais tolerante ao aquecimento do que as enzimas purificadas, sugerindo que fatores protéicos (ou impurezas) ainda não identificados estabilizariam as enzimas contra a desnaturação térmica.

Assim como o pH e a temperatura podem influenciar no crescimento microbiano, a idade da cultura pode determinar a produção das enzimas pectinolíticas. De acordo com Brumano et al. (1993) a idade do inóculo influenciou a síntese de enzimas pectinolíticas, mas não alterou a massa micelial de *Aspergillus niger* e *Aspergillus alliaceus*. Assim, concluiu-se que a produção das enzimas pode estar diretamente associada ao estado fisiológico em que o fungo se encontra e esta cultura pode estar em diferentes fases de maturação quando associado ao meio de cultivo, como: crescimento exponencial, estacionária ou decrescente.

Siessere (1991) verificou que em culturas mantidas em condição estacionária, teve-se uma pequena produção de PME e PG no 1º dia de incubação. A primeira atingiu os maiores níveis no 2º dia de cultivo e decresceu sua atividade após o 4º dia de cultivo. Enquanto que a segunda manteve-se estável a partir do segundo dia. Isso pode ter sido ocasionado por uma limitação no suprimento de oxigênio, já que a superfície de cultura estava coberta com uma fina camada micelial.

Outra razão para a estabilização e diminuição na atividade pectinolítica, observada após um período de tempo específico para cada microorganismo, pode estar relacionada ao consumo de algum composto essencial, aparecimento de um inibidor ou à própria desnaturação das enzimas já sintetizadas (Barnby et al., 1990).

Um outro fator que deve ser observado no cultivo de microorganismos é a concentração de nutrientes, pois esta pode afetar a velocidade de crescimento celular (Bravo, 2000).

Diferentes fontes de carbono podem influenciar no crescimento de microorganismos, como também na sua produção enzimática. Brumano et al. (1993) estudando a produção de poligalacturonase (PG) por *Aspergillus niger*, verificaram que a enzima foi produzida em meio contendo combinações de pectina e glicose.

De acordo com Silva et al., (2002) a síntese de pectinases por fungo está sujeita à repressão catabólica por grande concentração de açúcar afetando a indução e constituição enzimática. O efeito de diferentes fontes de carbono na síntese de pectinases por fungos cultivados em meio sólido tem sido muito estudado, e os resultados mostram que o meio ótimo para a produção de pectinases extracelular é o que possui substâncias pécticas como um indutor (Naidu & Panda, 1998).

Siessere (1991), também afirma que as enzimas pectinolíticas são induzíveis por várias substâncias pécticas, e o melhor indutor para a produção dessas enzimas por *Penicillium frequentans* foi a pectina. Porém, a proporção de nutrientes a serem combinados ao meio de cultivo, é dependente da enzima que se deseja obter em maior quantidade, pois de acordo com Martin et al., (2004) cada pectinase foi induzida pela presença de um nutriente específico. Assim, sugere-se que o meio de cultivo destinado ao crescimento de microorganismos produtores de pectinases seja uma fonte de carboidrato e pectina, que são necessários ao crescimento do microorganismo e à indução enzimática.

Atualmente muitos estudos têm sido conduzidos, visando a produção enzimática máxima, adicionando aos meios de cultivo diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Alguns microorganismos têm sua produção aumentada pela adição de nutrientes, porém outros produzem enzimas constitutivamente, mesmo na ausência de compostos pécticos. Sabe-se que a concentração de células pode aumentar com a concentração de nutrientes, porém, em

determinado momento, mesmo que se adicione mais nutrientes ao meio, o número total de células vai permanecer constante (Geoczze, 1994).

A escolha do meio de cultura é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo quanto a escolha do microorganismo. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do microorganismo favorece a formação dessas enzimas. A produção otimizada e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados sempre, pois as condições ótimas variam entre os diferentes microorganismos, assim como para diferentes enzimas (Bravo et al., 2000).

## **2.6 Fermentação em estado sólido**

A produção de enzimas em escala industrial se faz majoritariamente por fermentação submersa, porém em alguns países está crescendo cada vez mais a utilização da fermentação em meio semi-sólido para a produção de algumas enzimas, em especial aquelas envolvidas na degradação de polímeros vegetais complexos. Novos avanços tecnológicos estão sendo incorporados a esse processo, podendo torná-lo interessante para países que dispõem de resíduos agroindustriais de baixo custo (Couto & Sanromán, 2006).

Desde 1986 o Brasil iniciou uma série de projetos de pesquisas valorizando a adição de subprodutos da agricultura nos processos de crescimento e reprodução enzimática em estado sólido. Atualmente, a fermentação em estado sólido (SSF) tem mostrado grande potencial para a produção de enzimas. Essa fermentação pode ser de especial interesse naqueles processos onde o produto fermentado bruto pode ser usado diretamente como meio para produção enzimática (González et al., 2003).

Esse sistema de fermentação em estado sólido oferece numerosas vantagens quando comparado à fermentação em meio líquido, incluindo alto volume de produção enzimática, melhor circulação de oxigênio, extensa



disponibilidade desses produtos, baixo custo, escassos problemas operacionais, diminuição dos problemas de contaminação microbiana, menor geração de efluentes e requerimento de simples equipamentos para os processos fermentativos (Patil & Dayanand, 2006). Além disso os meios de cultura sintéticos são muito caros, e a opção geralmente é feita por meios que contenham apreciáveis quantidades de matérias-primas provenientes da agro-indústria (Lima, 2001).

Apesar das inúmeras vantagens, algumas desvantagens podem ser destacadas: as dificuldades no controle dos parâmetros do processo fermentativo (pH, temperatura, umidade e crescimento celular) e a necessidade de volumes relativamente grandes de inóculo. Apesar dessas desvantagens, a fermentação em estado sólido tem se mostrado eficiente para a produção de enzimas por fungos filamentosos ao se considerar a possibilidade de reprodução das condições de crescimento natural desses organismos (Couto & Sanromán, 2006).

Recentemente, um grande número de microrganismos, isolados de diferentes materiais estão se destacando por sua habilidade em degradar polissacarídeos presentes nos tecidos vegetais produzindo pectinases em meio de cultura sólido (Gomes et al., 2001; Soares et al., 2001).

Castilho et al. (2000), fizeram uma análise econômica na produção de lipase em meio sólido e líquido e constataram que o capital investido em um meio de fermentação líquido foi 78% maior que o necessário ao segundo. Esse estudo apontou uma grande vantagem ao meio de fermentação sólido, pois o custo de produção foi baixo quando comparado ao meio líquido.

Niture & Pant (2004) estudando a produção de poligalacturonase em meio sólido composto por farelo de trigo e bagaço de laranja observou que a atividade dessa enzima foi aumentada 3 vezes quando comparada com a atividade enzimática em meio de cultura líquido. Além disso, González et al. (2003) afirma que o meio de fermentação sólido (SSF) é mais produtivo que a

fermentação em meio submerso (SmF), pois as pectinases produzidas por SSF são mais estáveis ao pH e temperatura, além disso são menos afetadas pela repressão catabólica.

De acordo com Castilho et al. (2000), um dos fatores que beneficiam as condições de crescimento em meio sólido (SSF) é que estes estão mais próximos ao habitat natural de fungos filamentosos, quando comparado ao meio de cultura líquido. Assim, os microorganismos são capazes de crescer em substrato sólido e excretar maiores quantidades de enzimas. O material desperdiçado pelo processamento agroindustrial pode ser usado como substrato para o crescimento microbiano, valorizando os produtos que podem ser sintetizados e reduzindo a poluição ambiental.

A seleção do substrato para a produção enzimática em meio sólido depende de alguns fatores, como custo e disponibilidade do substrato, objetivo da produção enzimática e sua posterior aplicação. No processo de fermentação em estado sólido, o substrato sólido é responsável pelo fornecimento de nutrientes para o crescimento da cultura microbiana, como também por fornecer um “suporte” para as células. O substrato que oferece todos os nutrientes necessários ao crescimento do microorganismo pode ser considerado como um substrato ideal. Entretanto, alguns dos nutrientes podem estar disponíveis em baixas concentrações, ou então o substrato pode estar isento. Nesse caso, o substrato poderia ser suplementado com nutrientes específicos (Pandey, 1999).

Além dos fatores citados acima, outros são importantes para o crescimento microbiano e produção enzimática em um substrato sólido, incluindo o tamanho da partícula e o nível de umidade, podem ser considerados os pontos mais críticos. Geralmente substratos com partículas pequenas, fornecem uma maior superfície de área para o ataque microbiano. Porém, quando muito pequenos, podem resultar em uma acumulação na superfície do substrato podendo interferir na respiração e aeração microbiana, resultando

assim em um menor crescimento e desenvolvimento na cultura microbiana. Em contraste, partículas grandes promovem uma respiração e aeração mais eficiente, pois se tem um espaço entre as partículas, mas possuem uma limitada superfície para o ataque microbiano (Debing et al., 2006).

Sabendo-se que a síntese microbiana de enzimas em meio sólido (SSF) pode ser afetada por vários fatores, é importante observar alguns pontos antes do início da colonização, incluindo: seleção de um substrato e microorganismo adequados, pré-tratamento do substrato, tamanho da partícula (espaço entre – partícula e superfície de área) do substrato, disponibilidade de água no substrato, tipo e tamanho do inóculo, controle de temperatura de fermentação, período de cultivo e manutenção da uniformidade no meio de cultura (Pandey, 1999).

Atualmente os resíduos agroindustriais são considerados o melhor substrato para a fermentação em meio de cultivo sólido e o uso desse tipo de substrato está cada vez mais disseminado. Alguns dos substratos que estão sendo extensamente utilizados para o crescimento e produção enzimática por fungos filamentosos são: bagaço de cana de açúcar, farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de milho, palha de trigo, palha de arroz, casca de arroz, sabugo de milho, resíduos de banana, resíduos de chá, casca de café e outros resíduos industriais (Niture & Pant, 2004). A literatura revela que muitos trabalhos têm sido conduzidos destacando a produção de enzimas em substrato sólido como proteases, celulasas, lignases, xilanases, pectinases, amilases e glicoamilases.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da EPAMIG, ambos localizados na Universidade Federal de Lavras.

#### **3.1 Microrganismo utilizado**

O microrganismo utilizado foi o isolado do Agente Biológico G088, considerado um bom produtor enzimático, pois cresce facilmente em diferentes substratos (incluindo resíduos industriais), possui características de um microrganismo GRAS (não foram encontrados efeitos prejudiciais à saúde do homem), não necessita de suplementação de nutrientes ao meio de cultivo, pois se desenvolve bem em diversos resíduos industriais, além de produzir enzimas durante o seu metabolismo, as quais possuem inúmeras aplicações industriais. Isso faz com que o G088 apresente um destaque na produção enzimática, bem como na sua posterior aplicação no setor comercial, quando comparado com outros microorganismos produtores de pectinases.

O G088 utilizado nesse experimento é originado do café e foi obtido através da seleção de material coletado em quatro regiões produtoras do estado de Minas Gerais, no período de maturação dos frutos: Sul de Minas, Triângulo Mineiro, Alto Paranaíba e Zona da Mata. Foram realizadas várias coletas de frutos colonizados em cada região. Após as coletas os frutos foram encaminhados para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da EPAMIG, onde ocorreram os isolamentos, identificação e purificação dos isolados. Esses isolados foram então avaliados separadamente, quanto ao potencial de produção

enzimática, com o intuito de identificar o melhor isolado produtor de pectinases: poligalacturonase e pectinametilesterase.

Após a identificação e purificação do melhor isolado, denominado G088, foi realizada a inoculação no arroz substrato considerado padrão. O agente biológico não será divulgado por se tratar de objeto de patente, em fase de registro.

### **3.2 Condições de Cultivo**

Conforme citado anteriormente, nessa etapa utilizou-se o arroz, como substrato semi-sólido, o qual foi considerado como padrão para o crescimento e produção de pectinases a partir do G088. Análises químicas realizadas previamente, indicaram que o arroz utilizado foi composto de 2551,858 mg/100g de Pectina total, 129,1403 g/100g de Pectina solúvel, 3,89 g/100g de açúcar, 47,8% de umidade, 0,81% de extrato etéreo, 1,76% de fibra, 38,21% de fração glicídica e pH igual a 6,1.

Os experimentos foram conduzidos em frascos de vidro de 500 ml, previamente esterilizados. Para a preparação do meio de cultura foi feita uma mistura composta de 70g de arroz e 70 ml de água. Essa mistura foi autoclavada, durante 30 minutos, até alcançar a completa esterilização da amostra. Após esse período de esterilização, o meio de cultivo semi-sólido obtido, foi resfriado à temperatura ambiente para posterior inoculação do Agente Biológico G088.



### **3.3 Inóculo no meio de cultivo**

A fermentação foi conduzida inoculando-se esporos de G088 ao meio de cultivo semi-sólido, contendo o substrato arroz. Os esporos foram obtidos pela raspagem da superfície do meio de cultura (BDA), contendo a cultura esporulada, com alça de repicagem.

A suspensão foi, então, transferida para o meio de cultivo. Após a inoculação do G088 ao meio de cultura, este foi incubado em estufa BOD, com temperatura de 25°C e umidade controlada.

Com o objetivo de investigar se havia relação entre a produção de enzimas pectinolíticas e a idade das culturas, estas permaneceram em estufa durante 10, 15 e 20 dias, sendo observadas diariamente. Foi avaliado o período de tempo necessário para uma produção enzimática considerada ótima para o agente biológico em estudo.



### **3.4 Determinação da atividade da enzima poligalacturonase (PG)**

Após o período de 10, 15 e 20 dias de cultivo, foi determinada a atividade da enzima poligalacturonase (PG).

A obtenção do extrato enzimático de poligalacturonase foi realizada pela técnica descrita por Buecher & Furmanski (1978). A atividade de poligalacturonase (PG) foi determinada pela medida dos grupos redutores liberados do ácido poligalacturônico, segundo metodologia de Pressey & Avants (1973). A atividade foi determinada incubando-se o extrato enzimático com solução de ácido poligalacturônico a 0,25%, em tampão acetato de sódio, pH5,0, a 30°C por 3 horas. A reação foi interrompida em banho-maria fervente. Os grupos redutores foram determinados segundo a técnica descrita por Somogyi, modificada por Nelson (1944), usando-se ácido galacturônico como padrão. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a capacidade da enzima em catalisar a formação de um nanomol de ácido galacturônico.

### **3.5 Determinação da atividade da enzima pectinametilesterase (PME)**

Foi determinada a atividade da enzima pectinametilesterase, no 10º, 15º e 20º dia de fermentação.

O extrato enzimático de PME, foi obtido por Buecher & Furmanski (1978). A atividade de pectinametilesterase foi determinada por titulação dos

grupos carboxílicos liberados pela desesterificação da pectina devido à ação da enzima, pectinametilesterase (PME), de acordo com o método descrito por Jen & Robinson (1984). Utilizou-se como substrato uma solução de pectina cítrica a 1% em NaCl 0,2N, pH7,0, à temperatura ambiente. A taxa de desmetilação da pectina, adicionado ao extrato enzimático, foi medida pela titulação da mistura de reação com NaOH 0,01N, mantendo-se o pH 7,0 por 10 min. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a capacidade da enzima de catalizar a desmetilação da pectina correspondente a 1 nmol de NaOH por minuto, sob as condições de ensaio. Os resultados foram expressos em unidades de atividade enzimática por minuto por grama de peso fresco ( $U \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

### **3.6 Delineamento experimental**

Para analisar as variáveis correspondentes à atividade enzimática das enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase no ensaio de avaliação da produção enzimática em três intervalos de tempo (10, 15 e 20 dias), foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições para cada um dos três diferentes tempos de cultivos em dias.

Para as análises estatísticas foram utilizados os softwares estatísticos R<sup>®</sup> v2.3.1 (R, 2006) e o SISVAR<sup>®</sup> v4.3 (Ferreira, 2000).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Tempo de cultivo e produção de pectinases pelo G088

Quanto às características de crescimento da cultura, notou-se um crescimento fúngico nos três tempos de cultivo. Até o 10º dia de incubação, verificou-se um aumento rápido no diâmetro da colônia, preenchendo toda a superfície do substrato. Porém, após o 10º dia de cultivo, o crescimento do agente biológico G088 sofreu um declínio. Isso pode ter sido ocasionado por uma limitação no suprimento de oxigênio, já que a superfície da cultura estava coberta com uma fina camada micelial, pois o microrganismo já havia colonizado toda a superfície do substrato, restando apenas a parte intermediária e inferior do meio de cultivo.

Uma vez que o agente biológico G088 foi capaz de crescer em meio de cultivo arroz, considera-se que o microrganismo em estudo, tenha produzido pectinases, em especial poligalacturonase e pectinametilesterase, durante seu metabolismo. De acordo com as análises, o agente biológico G088 foi capaz de produzir poligalacturonase e pectinametilesterase em todos os tempos de cultivo: 10, 15 e 20 dias, cujas atividades estão apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1. Atividade média de pectinametilesterase e poligalacturonase para o ensaio com 3 tempos de cultivo

<b>Tempos (dias)</b>	<b>Atividade média Pectinametilesterase (nmol/g)</b>	<b>Atividade média Poligalacturonase (nmol/g)</b>
10	1480,0000	105,5244
15	773,3333	86,5800
20	526,6666	32,3600

Os resultados indicaram um efeito linear ( $P < 0,05$ ) do tempo de cultivo sobre a atividade de pectinametilesterase e poligalacturonase, sendo que a maior atividade enzimática foi obtida com 10 dias de cultivo, com o valor médio de 1480 nmol/g para PME e 105,52 nmol/g para PG. Porém, essa atividade foi reduzida gradativamente ao longo dos tempos de cultivo, sendo que no 20º dia as atividades de PME e PG caíram para 526,66 nmol/g e 32,36 nmol/g, respectivamente. Isso sugere que as colônias, com 20 dias de cultivo, não mais se encontravam em plena capacidade fisiológica para germinar e desenvolver-se (Figuras 1 e 2).

Resultado semelhante foi encontrado por Martin et al. (2004), utilizando resíduo industrial como substrato para a produção de pectinases por *Penicillium sp* EGC5, que apresentou um pico na produção de PG no 8º dia de cultivo, porém outra linhagem de fungo inoculada no mesmo substrato apresentou máxima produção de PG no 3º e 4º dia de cultivo. Sabendo-se que o meio de cultura utilizado interfere no tempo ótimo para a produção enzimática, Silva et al. (2002) estudou a relação entre substrato e tempo de cultivo na produção de PG por *Penicillium viridicatum* Rfc3, constatando que o pico de produção de PG esteve entre 4º e 6º dia de cultivo, quando o substrato era bagaço de cana de açúcar. Em meio composto de bagaço de laranja, farelo de trigo e milho, o pico de produção enzimática de PG e PME foi no 12º dia de fermentação. Assim, pode-se afirmar que o período ótimo para produção enzimática é bastante variável de acordo com o microorganismo e o meio de cultura utilizado.

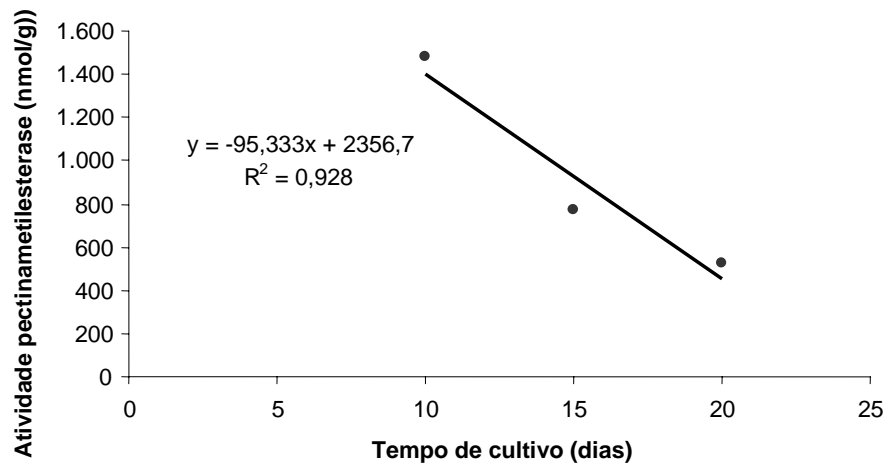


FIGURA 1. Efeito do tempo de cultivo (dias) sobre a atividade de pectinametilesterase, utilizando como substrato o arroz, inoculado com o agente biológico G088.

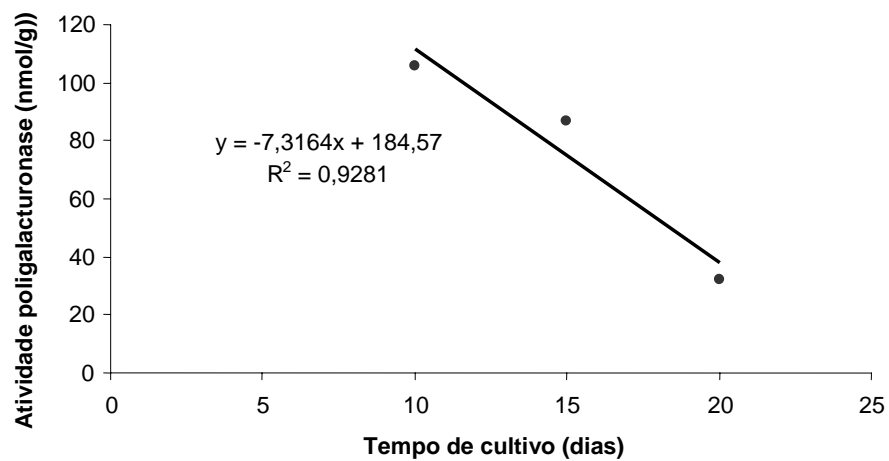


FIGURA 2. Efeito do tempo de cultivo (dias) sobre a atividade de poligalacturonase, utilizando como substrato o arroz, inoculado com o agente biológico G088.

Os resultados confirmaram que o agente biológico G088 é um produtor de pectinametilesterase (PME) e poligalacturonase (PG), sendo capaz de se adaptar ao meio semi-sólido. Nesse meio de cultivo, o tempo de incubação mais apropriado foram 10 dias. A razão para a diminuição na atividade pectinolítica, observada após o 10º dia de cultivo, pode estar relacionada à inúmeros fatores: consumo de algum composto essencial (oxigênio e nutrientes), aparecimento de um inibidor, instabilidade do substrato, perda de água dos meios, presença de proteases, acúmulo de metabólitos, os quais podem reprimir a síntese de PG e PME pelo isolado do agente biológico G088. Alguns autores sugerem um mecanismo de regulação enzimática em microorganismos, que consiste no bloqueio da produção de enzimas quando é alcançada uma determinada proporcionalidade entre concentração de enzima e número de células (Soares et al., 2001).

Entretanto, em sistemas complexos como o de incubação em estado sólido, ou semi-sólido é difícil inferir qualquer explicação para esse comportamento da enzima.

Os dados indicam que o agente biológico G088, apresentou um comportamento característico, pois Schwan & Rose (1994) relataram que em *Kluyveromyces marxianus* a produção máxima de PG ocorreu somente durante o crescimento celular, não sendo mais detectada quando a cultura alcançou a fase estacionária. Phutela et al. (2005) também relataram máxima produção de PME e PG por *Aspergillus fumigatus* em substrato sólido, depois de 2 dias de incubação (48 h), porém no 5º dia de cultivo, obteve-se um declínio na atividade enzimática.

Siéssere (1991) estudando a influência de diferentes fatores sobre a produção de pectinases de *Penicillium frequentans*, também observou uma redução na atividade enzimática com o tempo de cultivo, sugerindo que houve ou repressão da síntese das enzimas pectinolíticas ou inibição da atividade das

mesmas, por um ou mais produtos metabólicos da degradação enzimática da pectina.

Com base nesses resultados, o tempo de 10 dias de cultivo foi então escolhido para dar continuidade às etapas posteriores do trabalho, considerando-se a maior produção enzimática nesse período.

## 5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados, pode-se concluir que:

- Em meio de cultivo semi-sólido composto de arroz, o agente biológico G088 apresentou um aumento rápido no diâmetro da colônia, preenchendo toda a superfície do substrato até o décimo dia de incubação.
- Com 10 dias de cultivo, também ocorreu a máxima produção de pectinametilsterase e poligalacturonase, sendo então considerado tempo ótimo para a produção de pectinases, pelo G088.
- Ao longo do processo fermentativo, o agente biológico sofreu um declínio no seu crescimento, como também na sua atividade enzimática.
- Vários fatores podem ter contribuído para essa redução na produção de pectinases, um estudo detalhado caracterizando o agente biológico G088 quanto ao seu metabolismo, poderia esclarecer quais foram os possíveis fatores que levaram a essa queda na produção de pectinases.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, G.; TREJO, B. A.; GARCIA, J. M. Influence of pH on endo- and exo-pectinase production by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 37, n. 12, p. 912-971, Dec. 1991.
- 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.
- BACARAT, M. C.; VALENTIN, C.; MUCHOVEJ, J. J.; SILVA, D. O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. **Biotechnology Letters**, Oxford, v. 11, p. 899-902, 1989.
- BAILEY, M. J.; PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme Microbial Technology**, Worburn, v. 12, n. 4, p. 266-271, 1990.
- BARNBY, F. M.; MORPHETH, F. F. AND PYLE, D. L. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. Resolution, purification and partial characterization of the enzyme. **Enzyme Microbial Technology**, Worburn, v. 12, n. 11, p. 891-897, Nov. 1990.
- BATT, C. A.; SINSKEY, A. J. Use of biotechnology in the production of single-cell protein. **Food Technology**, Chicago, v. 38, n. 2, p. 108-111, Feb. 1989.
- BRACAT, M. C.; VANETTI, M. C. D.; ARAÚJO, E. F. Growth conditions of a pectinolytic *Aspergillus fumigatus* for degumming of natural fibers. **Biotechnology Letters**, Oxford, v. 13, p. 693-696, 1991.
- BRAVO, C. E. C.; CARVALHO, E. P.; SCHWAN, R. F.; GÓMEZ, R. J. H. C.; PILON, L. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, edição especial, p. 137-152, 2000.
- BRUMANO, M. H. N.; COELHO, J. L. C.; ARAÚJO, E. F. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions. **World Journal Microbiology Biotechnology**, London, v. 9, n. 2, p. 225-228, Mar. 1993.

BUESCHER, R. W.; FURMANSKI, R. J. Role of pectinesterase and polygalac in the formation of woolliness in peches. **Journal of Food Science**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 264-266, 1978.

CAO, J. M.; ZHENG, L. S.; CHEN, S.Y. Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degummig of ramie. **Enzyme Microbiology Technology**, Woburn, v. 14, n. 12, p. 1013-1016, Dec. 1992.

CARR, J. G. Tea, coffee and cocoa. **Microbiology of fermented foods**. London: Elsevier Applied Science, 1985. p 133-154. v. 2.

CASTILHO, L. R.; ALVES, T. L. M.; MEDRONHO, R. A. Recovery of pectinolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 181-186, Feb. 1999.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 71, n. 1, p. 45-50, Jan. 2000.

CELESTINO, S. M. C.; FREITAS, S. M.; MEDRANO, F. J.; SOUZA, M. V.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 33-42, May 2006.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Applications of solid-state fermentation to food industry- A review. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 76, n. 3, p. 291-302, Oct. 2006.

DALBOGE, H. Expression cloning of fungal enzyme genes: a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 29-42, Aug. 1997.

DEBING, J.; PEIJUN, Li.; STAGNITTI, F.; XIANZHE, X.; LI, Ling. Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 64, p. 244-250, 2006.



EL-REFAI, A. A.; METWALLI, S. M.; EL SABAIY, L. A. Influence of pH, inoculum concentration, aeration and growth period on production of pectolytic enzymes by *Aspergillus amamori* 16. **Chemistry Microbial Technology**, New York, v. 8, p. 115-117, 1984.

FALANGHE, H. Produção de microorganismos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia**: tecnologia das fermentações. São Paulo: E. Blucher, 1975. v. 1, p. 246-285.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA PARA A SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos, 2000. Universidade de São Carlos, 2000. p. 255-258.

FIDUREK, J.; ILCZUK, Z.; LOBARZEWSKI, J. Influence of the mycelium growth conditions on the production of amylolytic and pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. **ACTA Biotechnologica**, Berlin, v. 9, n. 4, p. 355-361, 1989.

FISCHER, R. L.; BENNETT, A. B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 675-703, 1991.

FREITAS, L. E. **Produção e caracterização parcial de poligalacturonase de *Penicillium expansum***. 1991. 67 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

GARZÓN, C. G.; HOURS, R. A. Citrus waste: An alternative substrate for pectinase production in solid state culture. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 93-95, 1992.

GEOCZE, M. L. A. **Efeitos de extrato de levedura, pH e outros fatores sobre a poligalacturonase de *Penicillium expansum***. 1994. 54 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

GOMES, E.; IEMBO, T.; SILVA, R. Production, characterization and properties of depolymerising enzymes from a *Curvularia inaequalis* strains. **Folia Microbiologica**, Pragne, v. 46, n. 4, p. 303-308, 2001.

GONZÁLES, G. V.; TORRES, E. F.; AGUILAR, C. N.; GOMEZ, S. J. R.; GOLDÍNEZ, G. D.; AUGUR, CHRISTOPHER, A. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 13, n. 2/3, p. 157-167, Mar. 2003.

GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. Fruit juices. **Industrial enzymology**. 2. ed. New York, 1996. 255-264 p.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases- a review. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, n.7, p. 987-996, Feb. 2003.

ISHII, S.; YOKOTSUKA, T. Purification and properties of endo-polygalacturonase from *Aspergillus japonicus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokio, v. 36, n. 11, p. 1885-1893, Nov. 1972.

JEN, J. J.; ROBINSON, M. L. P. Pectinolytic enzymes in sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Food Science**, Oxford, v. 49, p. 1045-1087, 1984.

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

JING, D. B.; LI, P. J.; LI, L.; STAGNITTI, F.; XIONG, X. Z. Pectinase production by solid fermentation from *Aspergillus niger* by a new prescription experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 64, n. 2, p. 244-250, June 2006.

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.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnología industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. cap. 14 e 15.

LOUDIERE, S.; DURAND, A.; GRAJEK, W. Temperature and influence on pectinolytic activities of some fungi cultured in solid state medium. **Journal European Congresso Biotechnology**, v. 3, p. 258-263, 1987.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 693-702, Sept./Oct. 2004.

MARTIN, N.; SOUZA, S. R.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 813-819, Sept./Oct. 2004.

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

MOYO, S.; GASHE, B. A.; COLLISON, E. K.; MPUCHANE, S. Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 1/2, p. 87-100, Aug. 2003.

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

NELSON, N. A photometric adaptation os Somogyi method for determination of glicose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 135, n. 1, p. 136-175, Jan. 1944.

NITURE, S. K.; PANT, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid médium by a strain of *Fusarium Moniliforme*. **Microbiological Research**, Jena, v. 159, n. 3, p. 305-314, 2004.

OLSON JR., J. C.; NOTTINGHAM, P. M. Temperatura. In: SILLIVER. J. H. **Ecologia microbiana de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1980.

PANDEY, A. Solid State Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 13, n. 2/3, p. 81-84, Mar. 2003.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; CARLOS, R. S.; POONAM, N. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, Bangalore, v. 77, n. 1, p. 149-162, July 1999.

PARDO, C.; LAPENA, M. A.; GACTO, M. Purification and characterization of an extracellular exopolysaccharidase from *Geotrichum lactis*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 37, n. 12, p. 974-977, Dec. 1991.

PATIL, S. R.; DAYANAND, A. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 97, n. 18, p. 2340-2344, Dec. 2006.

PILNIK, W.; VORAGEN, A. G. J. Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufacture. **Enzymes and food processing**. New York: Academic Press, 1993. P. 363-399.

PHUTELA, U.; DHUNA, V.; SANDHU, S. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 63-69, Jan./Mar. 2005.

PRESSEY, R.; AVANTS, J. K. Separation and characterization the escopolygalacturonase and indopolyg from peches. **Plant Physiology**, Rockville, v. 52, p. 252-256, 1973.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2006. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 2006

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MARCOVIC, O. PECTIC ENZYMES. In: TIPSON, R. S.; NORTON, D. (Ed.) **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**. New York: Academic Press, 1976. p. 323-385.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 39, p.213-294, 1993.

SHEEN Z.; MANNING G.; REESE, J. C.; REECK, G. R. Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L. ): Purification and characterization. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 209-214, Mar. 1999.

SCHWAN, R. F.; ROSE, A. H. Poligalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: Effect of medium composition. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 62-67, Jan. 1994.

SIÉSSERE, V. **Otimização das Condições de Cultivo para Produção e Caracterização parcial das enzimas pectinolíticas de *Penicillium frequentans***. 1991. 118 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SILIHA, H. A. I.; PILNIK, W. Cloud stability of apricot néctar. **Technology Komm. IFU XVIII**, p 325-334, 1985.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, Curitiba, v. 33, n. 4, p. 318-324, Oct./Dec. 2002.

SNYDER, H. E. Microbial sources of protein. In: CHICHESTER, C. O.; MRAK, E. M.; STEWART, G. F. **Advances in food research**. New York: Academic Press, 1970. v. 18, p. 85-140.

SOARES, M. M. C. N.; SILVA, R.; CARMONA, E. C.; GOMES, E. Pectinolytic enzymes production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Dordrecht, v. 17, n. 1, p. 79-82, Feb. 2001.

UEDA, S.; FUJIO, Y.; LIM, J. Y. Production and some properties pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A3. **Journal Applied Biochemistry**, New York, v. 4, p. 524-532, 1982.

URSINI, R. Opening remarks. In: DAVIS, P. **Single-cell protein**. New York: Academic Press, 1974. p 1-2.

YOSHITAKE, S.; NUMATA, T.; KATSURAGI, T. Purification and characterization of a pectin-releasing enzyme produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 77, n. 4, p. 370-375, 1994.

## **CAPÍTULO II**

### **EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PECTINASES PRODUZIDAS PELO AGENTE BIOLÓGICO G 088**

## RESUMO

CARVALHO, Sabrina. **Extração e purificação de pectinases produzidas pelo agente biológico G088**. 2007. Cap. II, p 50-100. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

As pectinases estão se destacando cada vez mais no setor industrial. Com relação a sua produção, ainda existe um campo grande para a sua expansão. Muitos estudos têm mostrado que grande parte dessas pectinases utilizada no setor comercial, é proveniente de extratos biológicos por isolamento, através de várias etapas de purificação e caracterização enzimática. Este capítulo objetivou purificar as enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase do agente biológico G088, com o intuito de caracterizar essas pectinases e posteriormente aplicá-las no setor comercial. Para o isolamento enzimático, foi empregado duas etapas: extração enzimática e precipitação enzimática. A extração do complexo enzimático foi obtida por homogeneização em soluções tampão em diferentes ph (4, 5 e 6), seguida de centrifugação e precipitação com sulfato de amônio em diferentes concentrações (20,40 e 60%). A atividade de pectinametilesterase e poligalacturonase foi avaliada em todas as etapas de purificação enzimática, segundo a metodologia de Jen & Robinson (1984) e Pressey & Avants (1973). O valor de proteínas totais também foi determinado juntamente com as análises enzimáticas, de acordo com o método de Micro-Kjeldahl, descrito pela A.O.A.C. (1990). De acordo com os resultados obtidos, o tampão benzoato pH 4,0 apresentou melhores condições para a extração de ambas as enzimas em estudo, porém nem todas as enzimas presentes no substrato foram extraídas, pois foi encontrada uma atividade enzimática significativa no resíduo resultante da etapa de extração, assim supõe-se que as pectinases de G088, são enzimas intracelulares, necessitando de outros métodos de ruptura celular para obter altos índices de purificação. As pectinases isoladas durante a extração, foram então precipitadas através de uma saturação com sulfato de amônio à 60%, com um índice de purificação de 14,24 e 1,39, para pectinametilesterase e poligalacturonase, respectivamente. Portanto conclui-se que com a precipitação enzimática foi possível aumentar o grau de pureza da enzima pectinametilesterase, porém a enzima poligalacturonase apresentou maior grau de pureza após a etapa de extração enzimática, com um índice de purificação igual a 2,95. A purificação parcial obtida foi bastante significativa,

---

\* Comitê de Orientação: Carlos José Pimenta - UFLA (Orientador); Sara Maria Chalfoun - UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – UFLA (co-orientadores)

porém devido a alta atividade enzimática presente nos resíduos do substrato após a etapa de extração enzimática, é necessário aplicar outras técnicas de purificação enzimática, com o intuito de obter altos índices de purificação enzimática.



## ABSTRACT

Carvalho, Sabrina. **Extraction and purification of pectinase produced by the biological agent G088**. 2007. Cap.II, p.50-100. Dissertation (Master in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

Day after day, the pectinase are getting special attention from industries and are becoming more and more important to this sector. In relation to its production, there is a great field to be explored. A great extension of studies have shown that part of these pectinase, used by industries, is gotten from biological extracts by isolation, through several stages of purifying and enzymatic characterization. This chapter aimed at purifying the pectinametilsterase enzymes and poligacturonase from the biological agent G088, in order to characterize these pectinases and then apply them to the market. For enzymatic isolation, it was necessary two stages: enzymatic extraction and enzymatic precipitation. The extraction of the enzymatic complex was done by homogenization in drain plug solution in different ph (4, 5 and 6), followed by centrifugation and precipitation with amonio sulfate in different concentrations (20, 40 and 60%). The pectinametilsterase and poligalacturonase were evaluated in all enzymatic purifying stages, according to the methodology of Jen and Robinson (1984) and Pressey and Avants (1973). The final protein value was also determined by the enzymatic analysis, according to Micro-Kjedahl method (1970), renewed by A.O.A.C. (1995). According to the results, the benzoate drain plug ph 4,0 showed better conditions for extracting both enzymes in studies, however not all the enzymes in the substratum were extracted because it was found a meaningful enzymatic activity in the extraction. So, it means that the pectinases from G088 are intracellular enzymes, and they need other cellular rupture methods to get high purifying rates. The isolated pectinases during the extraction were precipitated through saturation with amonio sulfate at 60%, with a purifying rate at 14,24 and 1,39, for pectinametilsterase and poligalacturonase, respectively. So, we came to conclude that with a precipitation enzyme was possible increase the purifying rate for pectinametilsterase, however the poligalacturonase increase the purifying rate after the extracting of enzyme, with a purifying rate at 2,95. The partial purification obtained was significant, however not all the enzymes in the

---

\* Committee Guidance: Carlos José Pimenta - UFLA (Adviser); Sara Maria Chalfoun - UFLA; Maria Emília de S. Gomes Pimenta – UFLA (co-advisers)

substratum were extracted, needing of new stages of enzymatic purifying, to get high purifying enzymatic rates.

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada às enzimas microbianas que catalisam a degradação de polissacarídeos pécticos, pois estão se tornando essenciais na indústria de alimentos e indústria têxtil. Devido ao grande interesse industrial nessas enzimas, denominadas pectinases, muitos estudos têm elucidado o papel das enzimas pectinolíticas no crescimento e desenvolvimento industrial.

Com relação à produção de enzimas pectinolíticas, ainda existe um campo grande para a sua expansão. Com freqüência, a síntese química desses compostos é muito difícil, impossível ou cara. Entretanto, eles podem ser obtidos a partir de extratos de materiais biológicos por isolamento. Assim, as pesquisas relacionadas à produção, purificação e caracterização de enzimas pectinolíticas, estão sendo um destaque no setor biotecnológico (Gummadi & Panda, 2003).

Atualmente, a utilização de pectinases tem aumentado progressivamente. A produção comercial de enzimas industriais em 1995, apresentou um valor estimado de vendas de \$1 bilhão, dos quais cerca de \$75 milhões foram obtidos pelas pectinases. Esses valores têm aumentado cada vez mais, pois em 2005, o valor estimado de vendas para as enzimas industriais esteve entre \$1,7-2 bilhões (Kashyap et al., 2001).

Considerando-se a crescente utilização de enzimas provenientes de microrganismos no mercado atual, diferentes procedimentos para isolamento e purificação de compostos de interesse bioquímicos são conhecidos e baseiam-se na forma, tamanho, carga iônica e polaridade de suas moléculas, geralmente combinando-se dois ou mais processos de separação.

Atualmente a preocupação com a escolha do método mais conveniente (econômico e eficiente) para a separação e purificação dos bioprodutos, despertou nos pesquisadores o interesse nas melhores formas de purificação de enzimas com potencial de uso em escala industrial. O desafio nos próximos anos não será apenas selecionar as melhores combinações de substrato e microrganismo capazes de produzir o composto enzimático, como também selecionar os melhores processos de purificação, visando obter um produto livre de interferentes, porém sem alterações de suas características funcionais.

De acordo com o exposto acima este trabalho foi desenvolvido com a finalidade de separar e caracterizar as pectinases (poligalacturonase e pectinametilesterase), produzidas pelo agente biológico G088.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Em geral as proteínas de interesse biotecnológico estão presentes em fluidos corporais como plasma sanguíneo, extratos de tecido animal ou vegetal, meio de cultura, cultura ou lise celular de microorganismos. Muitas vezes, para possibilitar a utilização dessas proteínas na área clínica, ou ainda, no desenvolvimento de pesquisas de base como caracterização físico-química, estudos cristalográficos e outros, há a necessidade de isolamento desta proteína das demais moléculas do meio de origem (Shen et al., 1996).

Nos processos de purificação enzimática, várias metodologias estão sendo aplicadas. De forma geral a purificação desejada é dependente do número de etapas empregadas no processo e do uso a que se refere o produto final. Perde-se atividade em cada etapa de purificação, por isso, para aumentar o rendimento, um número mínimo de etapas deve ser efetuado. A escolha das técnicas a serem empregadas está vinculada às propriedades moleculares inerentes a cada enzima; sendo assim, a combinação correta de várias etapas que exploram estas propriedades permitirá a purificação a partir de uma mistura. Frequentemente são necessários vários testes do tipo tentativa e erro para se estabelecer as condições ideais e o método mais efetivo para o rendimento e o número de vezes de purificação almejados (Lima et al., 2001).

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas ou células de animais constitui uma etapa complexa do processo, devido às variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse, como ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, hormônios, aminoácidos, peptídeos, proteínas e enzimas a proporção de água e de componentes inorgânicos. Como resultado dessa variedade de características descritas, as etapas de purificação são tão ou mais desafiantes que o estudo e o

desenvolvimento da etapa de cultivo, pois não há processos de purificação de aplicação geral (Pardo et al., 1991).

A determinação das condições de purificação para as quais uma proteína apresente a maior estabilidade possível, permitindo que diferentes procedimentos de fracionamento sejam utilizados com alto grau de recuperação, é altamente individual. Apesar de não haver critérios fixos para a seleção de procedimentos de isolamento e purificação, alguns procedimentos como ultracentrifugação, precipitação parcial, ultrafiltração, diálise e cromatografia são mais aplicados nos processos de purificação enzimática durante as etapas de extração, separação e concentração enzimática (Bracht & Ishii-Iwamoto, 2003).

## **2.1 Extração e Solubilização Enzimática**

Após o processo fermentativo, iniciam-se as operações de extração e separação enzimática. A primeira etapa na purificação é a obtenção de um extrato (extrato bruto) contendo a enzima. As etapas posteriores envolvidas na recuperação e processamento pós-fermentação dependem da localização da enzima de interesse (intra ou extracelular). A produção de preparados de enzimas intracelulares é mais complexa, pois envolve as etapas de ruptura celular e posterior separação dos constituintes intracelulares. Cada enzima possui uma forma de extração considerada ótima de acordo com suas características funcionais (Lima et al., 2001).

Para conseguir um meio de extração adequado, duas condições devem ser definidas: aquela na qual a enzima de interesse é estável e a condição na qual a enzima é mais eficiente liberada das células ou tecidos. A escolha final é, geralmente, um meio termo entre as duas. O uso de tampões durante as etapas de purificação é fundamental, não só para a adequada eficiência, bem como para evitar desnaturação e inativação enzimática. Normalmente, o pH escolhido para a solução tampão é aquele onde a atividade e estabilidade da proteína é máxima,

assim deve-se escolher a solução tampão em função do seu pKa, para ter a máxima capacidade tamponante. Além disso, a maioria das proteínas é maximamente solúvel em soluções de força iônica moderada, de 0,05 a 0,1M (Gummadi & Panda, 2003).

De acordo com Conway et al. (1988) a escolha do sistema de tampões é importante tanto no processo de purificação quanto na atuação das enzimas. Esses autores testaram três tampões, todos na concentração de 0,1M com o pH variando de 4,0-7,0, durante a extração de PG de *Penicillium expansum* e verificaram que o pH ótimo para a atividade das enzimas em todos os tampões foi 5,0-5,5. Entretanto a combinação ótima tampão-pH que resultou em máxima atividade de PG foi o tampão acetato de sódio a pH 5,5.

As primeiras etapas de um procedimento típico de fracionamento protéico consistem na lavagem do tecido (com solução tampão) e na aplicação de um entre vários métodos de lise celular existentes (métodos suaves, moderados e vigorosos). Os métodos de ruptura celular suave consistem em lise osmótica, digestão enzimática, solubilização química e trituração manual e são geralmente empregados para o tratamento de bactérias, extração de leveduras e lise de eritrócitos com água. Já os métodos de lise moderados são constituídos por homogeneização com o uso de liquidificador e trituração com abrasivo (areia, pérola de vidro) e são aplicados em bactérias e fungos e na maioria dos tecidos vegetais e animais. Além desses dois métodos de ruptura, ainda existem os métodos vigorosos, nos quais são empregadas a prensa francesa e sonificação. Utilizados em bactérias, fungos e tecidos vegetais (Gummadi & Panda, 2003).

Após a aplicação de um dos métodos de ruptura celular, uma centrifugação separa as proteínas solúveis dos restos das membranas e fragmentos insolúveis. Finalmente a amostra protéica pode ser analisada, fracionada ou estocada (Shen et al., 1999).

A separação das células pode ser feita por centrifugação ou filtração. Fungos filamentosos podem ser separados por centrifugação com relativa facilidade, no entanto, bactérias e leveduras podem necessitar de uma prévia floculação com agentes convencionais (sulfato de alumínio e cloreto de cálcio) ou com polieletrólitos. Tal procedimento é eficiente, de baixo custo, permitindo que a centrifugação seja feita em equipamentos menos sofisticados. A filtração constitui-se em alternativa para a centrifugação, sendo geralmente conduzida com auxiliares de filtração, em filtros-prensa ou filtros rotativos à vácuo (Illanes, 1994).

Siessere (1991) utilizou o método de filtração através de papel de filtro, adaptado a funil de Buchner acoplado a uma bomba de vácuo, para obter uma separação, em um meio de cultura líquido, entre os fluidos das culturas e as células fúngicas. No entanto, Shen et al. (1999) extraiu as enzimas de *Sitophilus oryzae* em meio semi-sólido por homogeneização em solução tampão, seguida de centrifugação, obtendo assim uma separação entre sobrenadante e extrato bruto.

No que se refere às enzimas intracelulares, a separação da biomassa celular com a centrifugação, já fornece um alto fator de concentração da enzima de interesse e, uma vez descartada a fase líquida, resulta um menor volume de material a ser doravante processado (em comparação com as enzimas extracelulares). No entanto as operações subseqüentes, de ruptura celular e posterior separação dos produtos, incidirão fortemente nos custos de produção (Voet & Voet, 1995).

Após a obtenção da biomassa, por centrifugação do extrato enzimático contendo enzimas intracelulares, esta deve ser lavada e as células rompidas para a liberação da enzima para o meio de extração. Diversas técnicas podem ser empregadas nessa operação: agitação com abrasivos, extrusão sólida e líquida, ultrassom, congelamento-descongelamento, choque osmótico, enzimas



hidrolíticas de parede, tratamento alcalino e uso de detergentes e solventes . Após a extração da enzima intracelular, os procedimentos posteriores de purificação não mais se diferem das enzimas extracelulares (Lima et al., 2001).

Enfim, as etapas de extração enzimática permitem remover substâncias tóxicas e/ou metabólitos indesejáveis e conferem características adequadas aos produtos a serem comercializados. Desta forma, seleciona-se uma fração na qual o composto de interesse está provavelmente presente. Com essa finalidade são, em geral empregados processos relativamente simples, caso o produto (preparação enzimática) seja de grau comercial ou técnico. Para a obtenção de preparações enzimáticas de uso analítico ou farmacêutico, processos mais sofisticados de purificação podem ser utilizados (Lima et al., 2001).

## **2.2 Separação**

Quando pretende-se obter uma preparação enzimática com maior grau de pureza, deve-se submeter o concentrado líquido a uma série de técnicas de fracionamento e purificação. Porém, quanto mais etapas forem necessárias para a purificação, menor será a recuperação protéica. Na literatura, há descrições de procedimentos de purificação nos quais, ao final, apenas 5% da proteína desejada foi purificada (Bracht & Ishii-Iwamoto, 2003).

As proteínas geralmente são purificadas pelo uso de sucessivos métodos de fracionamento. Em uma série de etapas independentes, as diferentes propriedades físico-químicas da proteína de interesse são utilizadas para separá-la progressivamente de outras substâncias. A idéia central é eliminar seletivamente outros componentes da mistura, de tal forma que só reste a proteína desejada. Existem vários métodos de fracionamento, dentre eles pode-se destacar: métodos baseados na diferença de solubilidade (uso de agentes precipitantes), métodos de fracionamento baseado no peso molecular (diálise, ultrafiltração) e métodos de fracionamento baseados na carga elétrica das

moléculas (cromatografia de troca iônica) (Bracht & Ishii-Iwamoto, 2003). A escolha do método a ser utilizado depende da disponibilidade de equipamentos e das características enzimáticas, porém alguns métodos de separação enzimática são menos dispendiosos.

A técnica de precipitação é considerada rápida e eficiente para a concentração de proteínas de interesse, sendo empregada para eliminar impurezas e aumentar a atividade específica da enzima-alvo. A precipitação de uma proteína em um extrato pode ser conseguida adicionando sais, solventes orgânicos ou polímeros orgânicos, ou alterando a temperatura e o pH da solução. Os agentes precipitantes mais comuns são sulfato de amônio, etanol, acetona e polietilenoglicol. Uma vez que cada proteína tem uma composição característica de aminoácidos que determina o seu comportamento como um eletrólito, é possível realizar um fracionamento protéico por precipitação diferencial, visto que nas condições onde algumas proteínas precipitam, outras permanecem em solução. Em alguns métodos de precipitação, observa-se que as proteínas são precipitadas com manutenção de alta percentagem de atividade original. Entre esses, os mais utilizados são a precipitação com sulfato de amônio, solventes orgânicos e polietilenoglicol (Lima et al., 2001).

### **Precipitação com sulfato de amônio**

A precipitação com sulfato de amônio, também conhecida como técnica de precipitação por força iônica, tem se difundido por ser de fácil execução e por apresentar bons rendimentos. Quando sais estão presentes em altas concentrações, as proteínas tendem a agregar-se é um efeito denominado precipitação por salificação (*salting-out*). São bastante complexas as bases físicas dessa precipitação. Um dos fatores é que a concentração elevada de sais pode remover a água de hidratação das moléculas protéicas, reduzindo, dessa maneira, sua solubilidade. Outros fatores, porém, podem estar envolvidos.

Qualquer que seja sua base física, a precipitação por salificação é um processo importante para a separação de misturas protéicas, uma vez que proteínas diferentes variam quanto a sua resposta à concentração de sais neutros. É importante lembrar que fatores tais como pH, temperatura e pureza da fração protéica contribuem para determinar o ponto de *salting out* de uma proteína em particular (Bracht & Ishii-Iwamoto, 2003).

O sulfato de amônio é preferido para essa precipitação em consequência de sua elevada solubilidade em água, o que permite atingir forças iônicas muito elevadas. Outras vantagens: as soluções protéicas em sulfato de amônio são estáveis por longos períodos e o sal pode ser removido facilmente por diálise, ultrafiltração ou coluna de dessalificação. As concentrações de sulfato de amônio são geralmente expressas em porcentagem de saturação (Miranda, 1997).

Algumas proteínas, principalmente de alto peso molecular, precipitam abaixo de 24% de sulfato de amônio, enquanto a maioria delas o fazem a 60%. Geralmente % de saturação acima de 60%, tem-se um declive na precipitação enzimática. O tempo necessário para a precipitação enzimática após a adição do sal também varia consideravelmente. Enquanto algumas enzimas precipitam nos primeiros 20 minutos, outras requerem várias horas para a completa precipitação. As diferenças na quantidade de sulfato de amônio e nos tempos necessários para completa precipitação são exploradas para o fracionamento das proteínas nos primeiros estágios dos protocolos de purificação (Bracht & Ishii-Iwamoto, 2003).

Shen et al. (1999) utilizou o sulfato de amônio à 85% de saturação durante a etapa de separação, para obter um precipitado enzimático. Porém, Miranda (1997) utilizou o sulfato de amônio à 50% de saturação em umas das etapas de purificação da enzima poligalacturonase de *Penicillium expansum*.

A precipitação com outros solventes como etanol, metanol, isopropanol é também uma técnica muito difundida industrialmente. Em geral, flocos facilmente sedimentáveis são obtidos, tornando simples a operação de separação. Devido ao risco de provocar desnaturação de proteínas, a operação deve ser conduzida em temperaturas baixas, em geral, inferiores a 0°C. Assim rendimentos adequados e seletividades médias só são obtidos em tais condições (Lima et al., 2001).

### **2.3 Purificação final**

Após as etapas de purificação enzimática é necessário obter uma fração concentrada e homogênea da enzima de interesse após a sequência de fracionamentos protéicos. Para alcançar uma solução homogênea geralmente utilizam-se diferentes passos cromatográficos podendo assim separar as enzimas de interesse. Além da cromatografia, também são utilizados ultrafiltração e liofilização nas etapas finais (Bracht & Ishii-Iwamoto, 2003).

Em consequência do avanço da tecnologia de processos com membranas, a separação de enzimas extracelulares geralmente é feita por ultrafiltração que tem se difundido e superado a utilização do processo de concentração por evaporação a vácuo. A solução concentrada pode sofrer uma simples filtração em meio filtrante de celulose ou equivalente, obtendo-se um preparado enzimático líquido, que uma vez diluído a níveis convenientes e acondicionado com estabilizantes da atividade enzimática, pode ser embalado para comercialização (Lima et al., 2001).

As etapas finais de produção consistem em purificações e acabamentos. O concentrado líquido pode ser considerado um produto bruto comercializável em certos mercados. Por diversas razões (aplicação, transporte, estocagem e outras) pode ser preferível a obtenção de um preparado enzimático bruto na

forma sólida. Nesse caso o concentrado deve ser seco à vácuo ou por atomização (Kula, 1987).

Enfim cabe frisar que o grau de purificação almejado está associado à aplicação do produto. Em algumas situações, pode não ser necessário trabalhar com uma fração homogênea da proteína. Nesses casos, apenas uma purificação parcial do extrato protéico bruto é realizada, de forma a tornar o processo mais econômico e rápido (Bracht & Ishii-Iwamoto, 2003).

Vários trabalhos têm descrito a purificação de enzimas pectinolíticas de bactérias, leveduras, fungos e plantas e muitas metodologias destinadas à purificação enzimática estão sendo testadas. No entanto não existe um método mais eficiente que o outro, pois cada metodologia possui suas etapas ajustadas de acordo com a disponibilidade de recursos, substrato de cultivo, localização enzimática (intra ou extracelular) e microrganismo produtor de enzimas pectinolíticas (Miranda, 1997).

Siessere (1991), separou as enzimas pectinolíticas, secretadas por *Penicillium frequentans* em meio líquido, por filtração, seguida de diálise com tampão citrato de sódio 0,1M pH 4,8, com o objetivo de eliminar interferentes. Após a diálise, efetuou-se a cromatografia em coluna DEAE-SEPHACEL, a porcentagem de recuperação foi em média 22,62% para PG e 31,26% para PME, nos melhores picos de recuperação cromatográfica. Quanto ao índice de purificação este variou entre 2,14-1,01 para PG e 1,62 para PME.

Chellegatti et al. (2002) também estudaram a purificação de uma exopoligalacturonase de *Penicillium frequentans* em meio líquido. O caldo de cultura foi separado do micélio por meio de filtração e posterior diálise em tampão tris-acetato (pH 6,5). Após a diálise a solução foi concentrada com polietilenoglicol e aplicada em uma coluna cromatográfica DEAE-sephacel. Terminada as etapas de extração enzimática, o índice de purificação 4,95 para PG foi superior ao relatado por Siessere (1991). Entretanto a comparação desses

valores de índice de purificação e fator de recuperação entre diferentes experimentos não é significativa, pois existe uma alta variabilidade entre as condições de cultivo entre um experimento e outro, podendo assim interferir no mecanismo de ação enzimática (Celestino et al., 2006).

Celestino et al. (2006) purificaram uma pectinase do fungo *Acrophialophora nainiana* em meio de cultura líquido através de ultrafiltração para concentrar a solução enzimática. O concentrado enzimático bruto foi então aplicado em colunas cromatográficas Sephacryl S-100, DEAE-Sepharose e Sephadex G-50, para a obtenção de um elevado fator de purificação e porcentagem de recuperação, os quais estiveram entre 9,37 e 62%, respectivamente.

Behere et al. (1993), trabalhando com purificação da enzima poligalacturonase em *Aspergillus niger*, isolaram três isoenzimas. A cultura foi primeiramente filtrada, centrifugada e o sobrenadante, liofilizado. Este foi aplicado a uma coluna Sephadex G-100. As frações foram coletadas, analisadas e concentradas por ultrafiltração. Foram distinguidas duas endopoligalacturonase e duas exopoligalacturonases, sendo 47% da atividade inicial recuperada.

Miranda (1997) purificou a enzima poligalacturonase de *Penicillium expansum* presente em meio de cultura líquido, através de várias etapas. O sobrenadante da cultura foi separado do micélio por meio de filtração, posteriormente o sobrenadante foi concentrado por liofilização. O liofilizado foi ressuspenso em 20 ml de tampão acetato de sódio pH 4,5. O sulfato de amônio sólido (50% de saturação) foi adicionado e após a precipitação enzimática essa solução foi centrifugada. Após a centrifugação o sobrenadante e o precipitado, este ressuspenso em solução tampão, foram dializados. Verificou-se que a maior parte da atividade de PG estava concentrada no precipitado, assim o sobrenadante foi descartado e o liofilizado foi aplicado em uma coluna DEAE sephadex. Dentre as fases de recuperação enzimática, a maior recuperação

enzimática (55%) ocorreu em precipitação com sulfato de amônia, porém o maior índice de purificação (92) foi obtido com o processo cromatográfico.

Niture & Pant (2004) estudando a caracterização bioquímica de pectinases produzidas por *Fusarium moniliforme* em meio de cultura semi-sólido, composto de farelo de trigo e bagaço de laranja, extraíram as enzimas desse meio de cultivo através da adição de tampão acetato 0,1M e pH 5,0. O material resultante da extração foi centrifugado para remover materiais celulares e a atividade da enzima bruta foi determinada. A purificação foi efetuada por ultrafiltração, seguida de diálise e cromatografia, objetivando a caracterização de diferentes frações enzimáticas de poligalacturonase e pectina liase.

Silva et al. (2002) utilizando resíduos agro-industriais para a produção de pectinase por *Penicillium viridicatum* RFC3, obteve uma separação das pectinases após 2 e 14 dias de cultivo em um meio contendo uma mistura de farelo de trigo e bagaço de laranja. Os substratos foram dispersos em etanol e mantidos a 20°C por 2 horas. Posteriormente centrifugou-se a solução por 20 minutos e o precipitado foi coletado e dissolvido em tampão tris-HCl (pH7,4) e aplicado em uma coluna Sephadex G 50 (3×100), sendo eluídas com o mesmo tampão. Observou-se a presença de 3 picos de PG e 2 picos de PI no extrato com 14 dias de cultivo, enquanto as soluções enzimáticas obtidas após 2 dias de fermentação resultou em 2 picos para PG e 4 picos para PI.

Pectina liase do fungo *Penicillium expansum* também foi parcialmente purificada (Silva et al., 1993). Após a extração realizada com sonificador, a preparação foi centrifugada e precipitada com sulfato de amônio (55-80% de saturação) e aplicada em uma coluna de DEAE- celulose. A purificação foi de 33 vezes.

Uma poligalacturonase obtida em meio sólido foi purificada, através de concentração seguida de aplicação da solução enzimática bruta em coluna cromatográfica Sephadex, sendo eluídos dois picos com atividade enzimática,

com um rendimento final de 1,3% (PG I) e 3,8% (PG II) e um fator de purificação de 19,6 e 60,5, respectivamente (Martin, 2004).

Shen et al. (1999) também obteve uma purificação de pectinametilesterase extracelular de *Sitophilus oryzae* em meio sólido, utilizando uma solução tampão 0,05M acetato de sódio, pH 4,6. Após a homogeneização do extrato enzimático em solução tampão, efetuou-se uma centrifugação durante 10 minutos para se obter um sobrenadante onde foi coletado o extrato bruto. O extrato bruto foi então saturado com sulfato de amônio à 85%. Após a precipitação, a solução foi centrifugada obtendo duas fases, sobrenadante e pellet. O pellet foi dissolvido em tampão tris-HCl, pH 8,7, e dializado no mesmo tampão. O dialisado foi então aplicado nas etapas posteriores de purificação, sendo aplicado em colunas cromatográficas Q-Sepharose, S-Sepharose, seguidas de HPLC e SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Através dessas etapas foi possível uma preparação altamente purificada sem perdas significativas de enzimas PME durante os processos de extração e purificação.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Microrganismo utilizado e condições de cultivo

O agente microbiano empregado no meio de cultivo foi o G088, descrito no capítulo anterior como uma linhagem em estudo, considerado um produtor de pectinases em meio semi-sólido. A técnica de preparação do meio de cultivo e inoculação do agente biológico foi a mesma empregada no capítulo anterior, onde o arroz foi utilizado como substrato semi-sólido para o crescimento e produção de pectinases a partir do G088. Utilizou-se o arroz como substrato, por ser uma fonte de carboidrato e pectina, os quais são necessários para a produção de pectinases por microorganismo. Análises químicas realizadas previamente indicaram que o arroz utilizado foi composto de 2551,858 mg/100g de Pectina total, 129,1403 g/100g de Pectina solúvel, 3,89 g/100g de açúcar, 47,8% de umidade, 0,81% de extrato etéreo, 1,76% de fibra, 38,21% de fração glicídica e pH igual a 6,1.

Os experimentos foram conduzidos em frascos de vidro de 500 ml, previamente esterilizados. Para o preparo do meio de cultura, foi feita uma mistura composta de: 70g de arroz com 70 ml de água. Essa mistura foi autoclavada, durante 30 minutos, até alcançar a completa esterilização da amostra. Após esse período de esterilização, o meio de cultivo semi-sólido obtido, foi resfriado à temperatura ambiente para posterior inoculação do Agente Biológico G088. Os esporos do agente biológico G088 foram inoculados no meio de cultivo semi-sólido (arroz), através de uma raspagem da superfície do meio de cultura (BDA) contendo a cultura esporulada, com alça de repicagem e a suspensão transferida para o meio de cultivo.

O microrganismo foi mantido em condições de cultivo (estufa BOD à 25°C), durante 10 dias, tempo ótimo para a produção de pectinases por G088, determinado no experimento anterior.

### **3.2 Determinação da atividade da enzima poligalacturonase (PG)**

Após o período de 10 dias de cultivo e durante todas as etapas de purificação enzimática foi determinada a atividade da enzima poligalacturonase (PG), com o intuito de determinar o rendimento e índice de purificação de cada etapa empregada no processo de purificação enzimática.

A obtenção do extrato enzimático de poligalacturonase foi realizada pela técnica descrita por Buecher & Furmanski (1978). A atividade de poligalacturonase (PG) foi determinada pela medida dos grupos redutores liberados do ácido poligalacturônico, segundo metodologia de Pressey & Avants (1973). A atividade foi determinada incubando-se o extrato enzimático com solução de ácido poligalacturônico a 0,25%, em tampão acetato de sódio, pH5,0, a 30°C por 3 horas. A reação foi interrompida em banho-maria fervente. Os grupos redutores foram determinados segundo a técnica descrita por Somogyi, modificada por Nelson (1944), usando-se ácido galacturônico como padrão. Uma unidade de atividade de PG (U) foi definida como sendo a capacidade da enzima em catalisar a formação de um nanomol de ácido galacturônico por minuto de reação.

### **3.3 Determinação da atividade da enzima pectinametilesterase (PME)**

Foi determinada a atividade da enzima pectinametilesterase após 10 dias de incubação e também durante todas as etapas de purificação enzimática, com o intuito de avaliar o rendimento e índice de purificação de cada etapa.

O extrato enzimático de PME, foi obtido por Buecher & Furmanski (1978). A atividade de pectinametilesterase foi determinada por titulação dos

grupos carboxílicos liberados pela desesterificação da pectina devido à ação da enzima, pectinametilesterase (PME), de acordo com o método descrito por Jen & Robinson (1984). Utilizou-se como substrato uma solução de pectina cítrica a 1% em NaCl 0,2N, pH7,0, à temperatura ambiente. A taxa de desmetilação da pectina, adicionado ao extrato enzimático, foi medida pela titulação da mistura de reação com NaOH 0,01N, mantendo-se o pH 7,0 por 10 min. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a capacidade da enzima de catalizar a desmetilação da pectina correspondente a 1 nmol de NaOH por minuto, sob as condições de ensaio. Os resultados foram expressos em unidades de atividade enzimática por minuto por grama de peso fresco ( $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

#### **3.4 Determinação do teor de proteínas totais e atividade enzimática específica**

Antes da extração enzimática, juntamente com as análises de atividade de pectinametilesterase e poligalacturonase, também foram determinados os níveis de proteínas totais, presentes no substrato após 10 dias de cultivo do agente biológico G088. Em todas as etapas de purificação enzimática, também foi necessário avaliar o teor de proteínas totais, de acordo com o método de Micro-Kjeldahl, renovado pela AOAC (1990), para posterior cálculo da atividade enzimática específica.

O cálculo da atividade enzimática específica é necessário durante as etapas de purificação enzimática, pois normalmente ocorre uma redução nos valores de atividade enzimática durante as etapas de purificação, porém os teores de proteínas também são reduzidos. A atividade enzimática específica considera esse valor de proteínas totais presentes na amostra, sendo indispensável este cálculo durante as etapas de purificação, onde tem-se uma redução em ambos os valores: atividade enzimática e proteínas totais. A atividade enzimática

específica representa o índice de atividade enzimática sobre o teor de proteínas totais, o qual está representado abaixo.

$$U \text{ específico} = \frac{U \text{ enzimático (nmol/g)}}{\text{Proteínas totais (mg)}}$$

### 3.5 Extração enzimática

Após o período de incubação, 90 ml de solução tampão 0,1N de benzoato (pH4,0), citrato (pH5,0) e fosfato (pH6,0) foram adicionados em béqueres contendo 15 g de substrato fermentado por G088. A extração do complexo enzimático foi realizada de acordo com Gummadi & Panda (2003), por homogeneização em politron, obtendo assim um extrato enzimático bruto. Para minimizar perdas devidas a desnaturação e proteólise as etapas de extração foram realizadas em banho de gelo (aproximadamente 4 °C).

O extrato enzimático bruto foi então centrifugado em centrífuga refrigerada à 4°C, em uma velocidade de 15,000g durante 15 minutos. Foram obtidas duas frações do extrato enzimático: sobrenadante 1 e precipitado (pellet).

Foram determinadas as atividades de proteínas totais, poligalacturonase e pectinametilsterase nas duas frações obtidas após a centrifugação: sobrenadante e precipitado (pellet). Como foram encontradas altas atividades de PME e PG no pellet, o mesmo foi solubilizado novamente em 90 ml solução tampão e centrifugado nas mesmas condições, obtendo-se assim o sobrenadante 2, onde foi investigado a presença das enzimas em estudo. A metodologia aplicada foram as mesmas utilizadas anteriormente.

Durante a apresentação dos resultados da etapa de extração enzimática, utilizaram-se algumas abreviaturas em tabelas e gráficos, estando representadas a seguir, com seus respectivos significados:

- Tampão benzoato (B), Tampão citrato (C) e Tampão fosfato (F).

- Sobrenadante 1 (S1) → sobrenadante resultante da centrifugação do extrato enzimático bruto.
- Sobrenadante 2 (S2) → sobrenadante resultante da solubilização do pellet.
- Pellet → precipitado resultante da centrifugação do extrato enzimático bruto.



### **3.6 Separação enzimática ou precipitação**

Considerando-se que durante a centrifugação as paredes celulares e fragmentos insolúveis ficaram alojados no precipitado, utilizou-se o sobrenadante como meio para posterior precipitação enzimática, denominado extrato enzimático.

Como o tampão benzoato (pH 4,0) foi o melhor meio extrator, utilizou-se o extrato enzimático dessa solução, para saturação com sulfato de amônia. Foi tomado um volume de 60ml da solução sobrenadante 1 do tampão benzoato para cada saturação: 20%, 40% e 60%. As concentrações de sulfato de amônia são geralmente expressas em % de saturação. Para a determinação da quantidade em gramas de sulfato de amônia a ser adicionado na solução, utilizou-se a fórmula

de Peralta (1990). A equação determina a quantidade M em grama, de sulfato de amônia necessária para fazer 1 litro de solução:

$$M = \frac{533 (SF - SI)}{100 - 0,32 SF}$$

SF= saturação final desejada SI= saturação inicial

O sulfato de amônia foi adicionado aos poucos e a solução foi agitada lenta e constantemente com um bastão de vidro. Todo esse processo foi realizado em banho de gelo. Após a adição a solução foi mantida em refrigerador à 4°C por 1 hora, para que a precipitação ocorresse em maior grau.

Terminado o período de repouso em geladeira, a solução foi centrifugada à 4°C, 15,000g durante 15 minutos. Com a centrifugação foi possível obter duas fases: sobrenadante e precipitado.

O sobrenadante e precipitado foram então recolhidos e determinado o teor de proteínas totais, poligalacturonase (PG) e pectinametilesterase (PME). O sobrenadante e precipitado resultante da adição de sulfato de amônio com posterior centrifugação foram então chamados de S III e P III, respectivamente.

### **3.7 Cálculo do rendimento e índice de purificação**

Terminada a purificação enzimática parcial, foi calculado o rendimento e índice de purificação em todas as etapas de purificação, os quais foram calculados pela seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{U purificado}}{\text{U ext. Bruto}} \times 100$$

O cálculo do percentual de rendimento mostra a evolução da atividade enzimática durante as etapas de purificação enzimática, porém sem considerar o teor de proteínas presentes na amostra. Nem sempre esse valor tende a aumentar,

uma vez que os valores de atividade enzimática durante as etapas de purificação tendem a diminuir, porém os valores de proteínas totais também diminuem e nesse cálculo não foram considerados os valores de proteínas totais.

$$\text{Índice de Purificação} = \frac{\text{U específico purificado}}{\text{U específico ext. Bruto}} \times 100$$

Já o índice de purificação é mais preciso na quantificação da atividade enzimática durante as etapas de purificação, pois utiliza-se a atividade enzimática específica. Nos processos de recuperação enzimática seu valor tende a aumentar, visto que o valor de U/mg de proteína também aumenta com as sucessivas etapas de purificação.

### **3.8 Delineamento experimental**

Para a análise das variáveis representadas pela atividade enzimática de pectinametilesterase e poligalacturonase, foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições para cada combinação de substrato e tampão. Inicialmente foi realizada uma análise exploratória dos dados, por meio da construção de um Boxplot, o qual apresentou a atividade enzimática em cada solução extratora. Os demais dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância (nível de significância de 5%); sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott e por meio de contrastes pré-estabelecidos pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade.

Para analisar as variáveis enzimáticas pectinametilesterase e poligalacturonase, na etapa de precipitação enzimática, também foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições de

acordo com três níveis de saturação (20, 40 e 60%) com o agente precipitante, sulfato de amônio. Os dados foram interpretados estatisticamente, por meio de análise de variância (nível de significância de 5%); sendo as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Para as análises estatísticas foram utilizados os softwares estatísticos R<sup>®</sup> v2.3.1 (R, 2006) e o SISVAR<sup>®</sup> v4.3 (Ferreira, 2000).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Atividade enzimática do substrato inicial

Após o período de colonização do substrato (10 dias) foram determinadas as atividades de pectinametilesterase (PME) e poligalacturonase (PG) no filtrado inicial (representados Tabela 1), para posteriores comparações desses valores, com os obtidos nas etapas de extração e purificação parcial de PME e PG.

TABELA 1. Atividade média de pectinametilesterase e poligalacturonase para o ensaio com 10 dias de cultivo do agente biológico G088 em substrato semi-sólido arroz.

	Atividade Pectinesterase (nmol/g)	Atividade Poligalacturonase (nmol/g)
Média observada	1340,00	107,6293

Juntamente com as análises de pectinametilesterase e poligalacturonase, também foi determinado o teor de proteínas totais que apresentou um valor de 42 mg no filtrado inicial. As análises de proteínas totais, são necessárias ao cálculo de atividade enzimática específica e índice de purificação das enzimas em estudo.

### 4.2 Extração Enzimática

Sabendo-se que a maioria das pectinases são estáveis em pH ácido foram testadas 3 soluções tampão: benzoato (pH 4,0), citrato (pH 5,0) e fosfato

(pH 6,0), com o intuito de caracterizar a enzima quanto ao seu pH ótimo para a atividade das enzimas pectinametilsterase (PME) e poligalacturonase (PG).

As Tabelas 2 e 3 mostram as atividades das enzimas pectinametilsterase e poligalacturonase, em diferentes frações das soluções extratoras. Os resultados evidenciam que o tampão Benzoato pH 4,0 apresentou melhores condições para a extração de ambas as enzimas em estudo.

TABELA 2. Atividade média de pectinametilsterase para o ensaio com 4 tipos de combinação de substrato e solução tampão extratora.

<b>Soluções extratoras</b>	<b>Atividade pectinametilsterase (nmol/g)</b>
Benzoato S1	1.671,4286 b
Benzoato S2	1.350,0000 c
Benzoato P	3.299,9999 a
Citrato P	964,2857 d

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott Knot ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação à enzima PME, não foi encontrada nenhuma atividade desta enzima no sobrenadante do tampão citrato e em nenhuma fração do tampão fosfato (Figura 1). Assim, foram excluídos da análise os tratamentos Citrato S1 e S2, Fosfato S1, S2 e P por apresentarem todos os valores iguais a zero.

De acordo com os resultados, pode-se notar que a maior atividade de PME esteve presente no pellet do tampão benzoato (3299,99 nmol/g), seguido do sobrenadante 1 (1671,42 nmol/g) e 2 (1350,00 nmol/g) do mesmo tampão. O tampão citrato foi o que apresentou menor atividade enzimática (964,28 nmol/g).

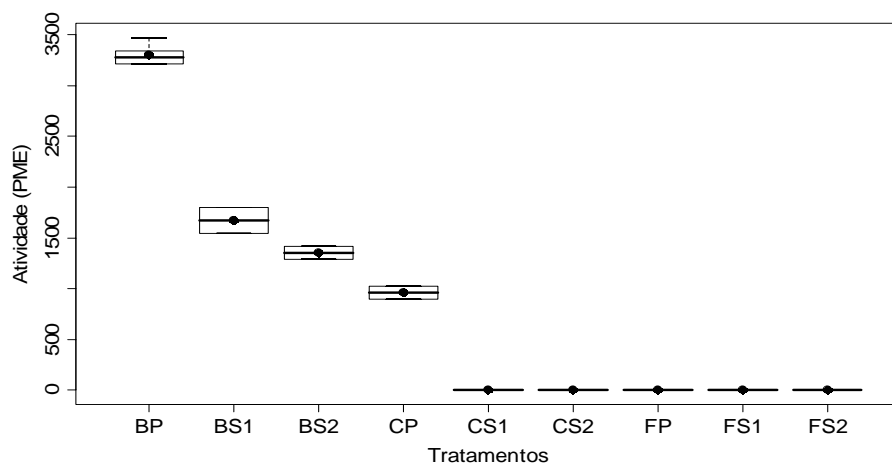


FIGURA 1. Box plot para os resultados da atividade de pectinamylesterase (nmol/g) em ensaio com 9 tipos de combinação de substrato e tampão, sendo as médias representadas pelo símbolo “•”

Como mostra a figura 2, a melhor solução tampão para a extração da enzima poligalacturonase, também foi o tampão benzoato (pH 4,0). A enzima poligalacturonase apresentou maior atividade (163,4498 nmol/g) no pellet deste mesmo tampão. Em relação ao tampão fosfato, não foi encontrada nenhuma atividade enzimática no pellet desse tampão, assim essa solução extratora não foi apresentada na tabela acima, por apresentar valor igual a zero.

TABELA 3. Atividade média de poligalacturonase para o ensaio com 8 tipos de combinação de substrato e solução tampão extratora.

<b>Soluções extratoras</b>	<b>Atividade poligalacturonase (nmol/g)</b>
Benzoato S1	52,5937 b
Benzoato S2	40,6296 c
Benzoato P	163,4498 a
Citrato S1	26,8057 d
Citrato S2	24,3702 e
Citrato P	39,8385 c
Fosfato S1	50,0497 b
Fosfato S2	27,9355 d

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott Knot ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 3, dentre as frações sobrenadantes obtidas, o tampão citrato (pH 5,0) foi o que apresentou menor atividade enzimática (26,8057 nmol/g). O tampão benzoato S1 e fosfato S1 não apresentaram diferença, segundo o teste de Scott Knot, em relação à atividade de poligalacturonase. Assim, foi feito um contraste da atividade de poligalacturonase entre as frações sobrenadantes de cada tampão, com o intuito de enfatizar qual solução tampão apresentou maior atividade enzimática no sobrenadante. A análise de variância de 3 contrastes (benzoato S1, citrato S1 e fosfato S1) da atividade de poligalacturonase, foi significativo a 1% de probabilidade pelo teste F, confirmando que, dentre as frações sobrenadantes, a que apresentou uma maior atividade enzimática foi o tampão benzoato (52,5937 nmol/g).

Como o sobrenadante 2 do tampão benzoato apresentou atividade enzimática inferior ao sobrenadante 1 para ambas as enzimas (pectinametilsterase e poligalacturonase), este foi então descartado, utilizando

assim o sobrenadante 1 como meio para posterior precipitação enzimática nas etapas posteriores. Além disso, também foi invalidada a hipótese na qual nova lavagem do pellet resultante da centrifugação em solução tampão poderia resultar em uma recuperação das enzimas presentes nesse pellet.

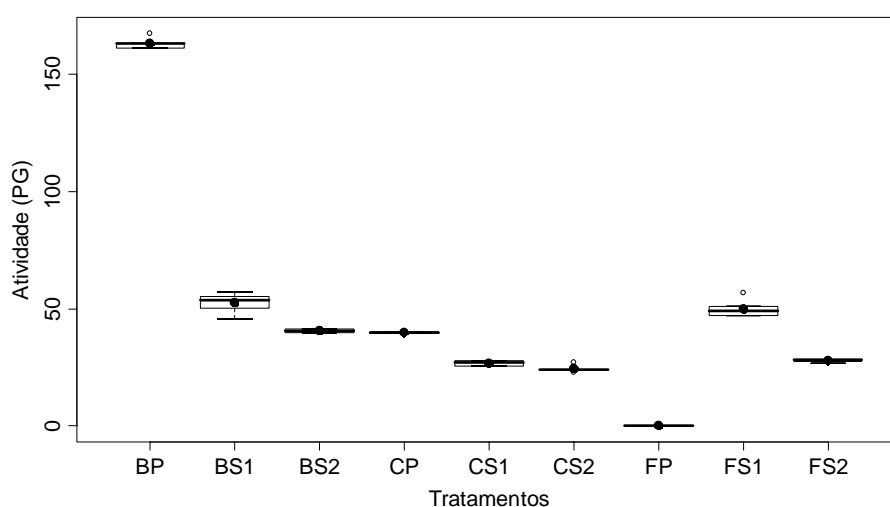


FIGURA 2. Box plot para os resultados da Atividade de poligalacturonase (nmol/g) em ensaio com 9 tipos de combinação de substrato e tampão, sendo as médias representadas pelo símbolo “•”

Nota-se que a maior atividade enzimática ocorreu em pH ácido (4,0), este valor de pH ótimo de reação está incluído no intervalo de pH ótimo encontrado para outros fungos, que geralmente varia de 3,8 a 5,5 (Bailey & Pessa, 1990). Várias hipóteses podem justificar uma maior atividade enzimática em meio ácido: Siessere (1991) mostra que as enzimas pectinolíticas purificadas são inativas em pH alcalino. As poligalacturonases podem ser degradadas por proteases em pH alcalino e isso pode ser evitado com a manutenção de um pH

baixo (Malvessi & Silveira, 2004). O pH também influencia a atividade enzimática por meio de modificações conformacionais que ocorrem na molécula, proporcionando alterações no seu sítio ativo, que resultam na redução ou no aumento de sua afinidade com o substrato (Geoczze, 1994).

De acordo com o que foi exposto acima comprova-se que cada enzima é estável em um pH, o qual é considerado ótimo para a sua ação sobre a molécula de substrato. No entanto, Castilho et al. (2000), obtiveram resultados semelhantes para pectinases de *Aspergillus niger*, onde o solvente mais apropriado para a extração de pectinases foi o tampão acetato com pH 4,0. Resultados semelhantes também foram encontrados por Coelho et al. (1995) e Gárzon & Hours (1992).

Outros trabalhos mostram que o pH ótimo para as enzimas poligalacturonase e pectinametilesterase está entre 4,0 e 5,0. Schwan et al. (1997) avaliaram a atividade de *Kluyveromyces marxianus* em meio com diferentes valores de pH e verificaram que a atividade enzimática máxima para PG foi obtida em pH 5,0 para *Kluyveromyces marxianus* e 4,5 para PG secretada por *S. cerevisiae*. Malvessi & Silveira (2004) também verificaram que pH ótimo para a atividade enzimática de poligalacturonase de *Aspergillus oryzae* foi 4,7 e constatou que a baixa atividade ou completa inativação enzimática em valores de pH muito ácido (2,0) ou básico (pH 8,0 a 9,0) pode ser atribuída à instabilidade da enzima.

Martins et al. (2002) produziram PG por *Thermoascus aurantiacus* 179-5 utilizando fermentação em estado sólido com bagaço de laranja, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como fonte de carbono, a qual mostrou atividade máxima em pH 5,0. Phutela et al. (2005) extraiu as enzimas pectinesterase e poligalacturonase de *Aspergillus fumigatus* avaliando sua estabilidade em diferentes soluções tampões com pH de 3,0-9,0. Os resultados indicaram que o pH 4,0 foi mais adequado para a atividade de pectinametilesterase enquanto a

enzima PG foi ativa em pH 5,0. Essa tendência de variação na atividade enzimática quanto ao pH é semelhante à observada por Patil & Dayanand (2006) os quais consideraram o pH 5,0 ótimo para a produção de pectinases em estado sólido.

De acordo com estes resultados, pode-se afirmar que a combinação ótima tampão-pH que resultou em máxima atividade de PG foi o tampão benzoato (pH 4,0), assim o pH ótimo de reação para o agente biológico G088 está incluído no intervalo de pH ótimo encontrado para outros microrganismos produtores de pectinases (Celestino et al., 2006).

#### 4.3 Precipitação enzimática

De acordo com os resultados anteriores, verificou-se uma maior atividade enzimática nas frações do tampão benzoato (pH 4,0). Foi utilizado o sobrenadante 1 (extrato enzimático) deste mesmo tampão como meio para precipitação enzimática, com o intuito de eliminar seletivamente outros componentes da mistura, de tal forma que só reste as enzimas desejadas.

Os resultados da atividade média de pectinametilsterase e poligalacturonase obtidos em 3 níveis de saturação, estão representados na Tabela 4.

TABELA 4. Atividade média de pectinametilsterase e poligalacturonase em três níveis de saturação da solução enzimática com sulfato de amônio.

<b>% Saturação</b>	<b>Pectinametilsterase (nmol/g)</b>	<b>Poligalacturonase (nmol/g)</b>
20%	321,4286	3,6083
40%	942,8571	6,7269
60%	1454,1428	11,3615

Esse experimento mostrou que uma saturação com 60% de sulfato de amônio foi suficiente para remover a água de hidratação das moléculas de pectinases, reduzindo assim sua solubilidade e resultando em um precipitado enzimático. Assim, a atividade enzimática apresentada na tabela acima, à 60% de saturação, refere-se ao precipitado enzimático. Verificando o efeito dessa variável estudada (sulfato de amônio), nota-se uma maior atividade enzimática para pectinametilesterase (1454,1428 nmol/g) e poligalacturonase (11,3615 nmol/g) no precipitado ao nível de saturação 60%. Também foi verificado se no sobrenadante remanescente havia a presença de pectinases. De acordo com as análises, não foi encontrada nenhuma atividade de pectinametilesterase e poligalacturonase na fração sobrenadante a nível de 60% de saturação. Também foi verificado se uma saturação com 70% de sulfato de amônio era suficiente para obter um precipitado enzimático com maior atividade enzimática que a saturação a 60%. De acordo com as análises, com 70% de saturação as enzimas não precipitaram.

Nas saturações com 20% e 40% de sulfato de amônio, não foi possível obter um precipitado enzimático, ou seja, essa saturação não foi suficiente para precipitar as enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase. No entanto, os valores de atividade enzimática à 20% e 40% de saturação, são referentes a fração sobrenadante.

As figuras 3 e 4 mostram a regressão linear na atividade enzimática em 3 níveis de saturação utilizados.



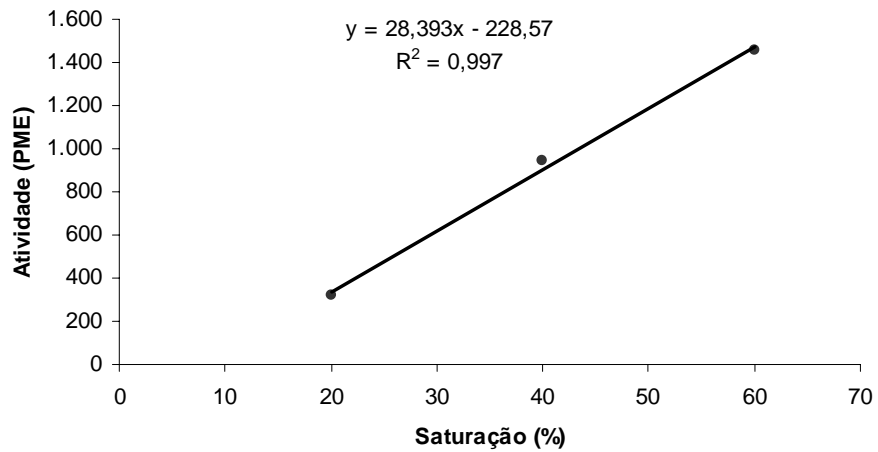


FIGURA 3. Gráfico do ajuste da equação de regressão linear da Atividade de pectinametilesterase (nmol/g) para o ensaio com 3 níveis de saturação (20, 40 e 60%) da solução enzimática.

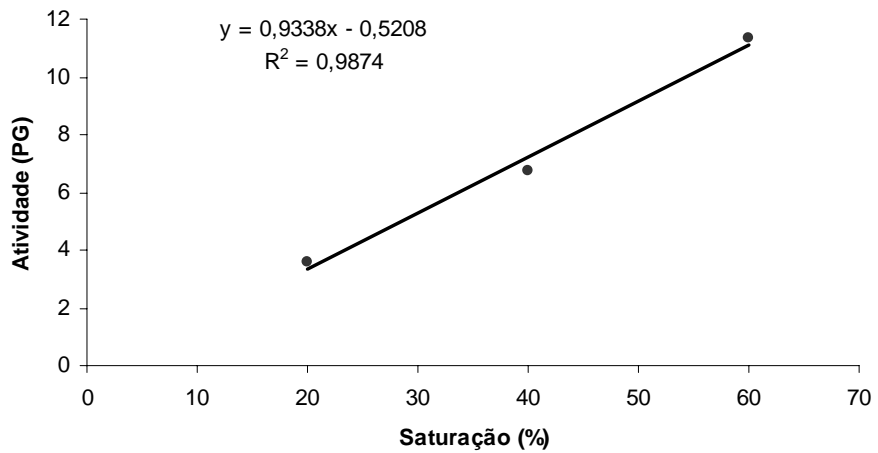


FIGURA 4. Gráfico do ajuste da equação de regressão linear da Atividade de poligalacturonase (nmol/g) para o ensaio com 3 níveis de saturação (20, 40 e 60%) da solução enzimática.

Os valores obtidos encontram-se dentro da variação proposta por Bracht & Ishii-Iwamoto (2003), onde a maioria das proteínas precipitam à 60% de sulfato de amônio. Porém, outros autores têm precipitado pectinases de diferentes microorganismos em concentrações que vão de 50% à 85% de sulfato de amônio. Shen et al. (1999) precipitou a enzima pectinametilesterase presente no extrato bruto de *Sitophilus oryzae* através de uma saturação com sulfato de amônio a 85% . Miranda (1997) também precipitou as enzimas presentes no extrato enzimático bruto de *Penicillium expansum* através de sulfato de amônio sólido a 50% de saturação, obtendo assim duas frações sobrenadante e pellet. O sobrenadante foi descartado e o pellet empregado nas etapas posteriores de purificação enzimática.

Os dados de recuperação da atividade pectinolítica e o índice de purificação (I.P.) das etapas de purificação enzimática do G088 estão representados nas Tabelas 5 e 6, onde, sobrenadante e precipitado I referem-se a 1ª centrífuga onde se obteve o extrato enzimático bruto (item 4.6). Já o sobrenadante e precipitado III, referem-se a 2ª centrífuga, após a adição de sulfato de amônio (agente precipitante).

TABELA 5. Sumário do processo de separação da enzima pectinametilesterase do extrato enzimático bruto da cultura do agente biológico G088.

<b>Etapas de purificação</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Atividade enzimática (nmol/g)</b>	<b>Específica (U/mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Índice de Purificação</b>
Cultura Inicial	42	1340,0000	31,9	100	1
Sobrenadante I	7	1671,4286	238,7	124,73	7,5
Sobrenadante III	3,1	0	0	0	0
Precipitado I	11,6	3299,9998	284,48	246,26	8,92
Precipitado III	3,2	1454,1428	454,42	108,74	14,24

TABELA 6. Sumário do processo de separação da enzima pectinametilesterase do extrato enzimático bruto da cultura do agente biológico G088.

<b>Etapa purificação</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Atividade enzimática (nmol/g)</b>	<b>Específica (U/mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Índice de Purificação</b>
Cultura inicial	42	107,6293	2,55	100%	1
Sobrenadante I	7	52,5937	7,51	48,86%	2,95
Sobrenadante III	3,1	0	0	0	0
Precipitado I	11,6	163,4498	14,09	151,8%	5,52
Precipitado III	3,2	11,3615	3,55	10,55%	1,39

De acordo com as tabelas acima, nota-se um maior rendimento na etapa de extração enzimática para ambas as enzimas PME e PG, cujos valores de rendimento ou recuperação enzimática foram, 246,26% e 151,8%, respectivamente. Nota-se também que esse rendimento foi encontrado no pellet da etapa de extração enzimática. O sobrenadante desta mesma etapa também apresentou um bom rendimento 124,73% (PME) e 48,86% (PG), porém inferior ao pellet. Entretanto, o cálculo do porcentual de rendimento não leva em consideração o teor de proteína total presente na solução e de acordo com a tabela acima, observa-se que durante as etapas de extração enzimática o valor de proteína total também foi reduzido juntamente com a atividade enzimática.

Para o cálculo do índice de purificação enzimática (I.P.) utiliza-se a atividade enzimática específica, ou seja, considera a correlação entre os valores de atividade enzimática e proteína total, sendo mais preciso para demonstrar a recuperação enzimática no decorrer das etapas de purificação. Como foi citado no parágrafo anterior, o maior rendimento foi constatado na etapa de extração enzimática, porém, de acordo com o índice de purificação, obteve-se maior purificação da enzima pectinametilesterase durante a etapa de precipitação enzimática com sulfato de amônio, alcançando um índice de purificação igual à

14,24. Esse valor nos informa que foi possível aumentar em média 14 vezes a atividade enzimática, utilizando o sulfato de amônio à 60% como agente precipitante.

De acordo com o índice de purificação, notou-se uma elevada atividade enzimática no precipitado I, ou seja, não foi possível extrair grande parte da enzima presente no substrato inicial. Esse resultado não era esperado pois acreditava-se que, com a solubilização do substrato em solução tampão com posterior lise celular, as enzimas seriam liberadas para o meio de extração, sendo encontrada maior atividade ou maior rendimento na fração sobrenadante. Porém, de acordo com os resultados da etapa de extração, verificou-se um maior rendimento no pellet e não no sobrenadante como era esperado. Assim, supõe-se que as enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase do agente biológico G088, possam ser enzimas intracelulares.

Voet & Voet (1995), justifica essa elevada % de rendimento apenas com a centrifugação de enzimas intracelulares, como foi observado no presente estudo. Segundo este mesmo autor, apenas a centrifugação já fornece um alto fator de concentração da enzima de interesse, pois uma vez descartada a fase líquida, tem-se um menor volume de material a ser doravante processado (em comparação com as enzimas extracelulares).

Sabendo-se que a produção de preparados de enzimas intracelulares é mais complexa, pois envolve as etapas de ruptura celular e posterior separação dos constituintes intracelulares, conclui-se que outras etapas seriam necessárias para a purificação total das pectinases em estudo. O processo de separação utilizado não proporcionou uma adequada separação das enzimas, mostrando ser necessário um outro método de purificação para melhor separação enzimática.

Apesar das considerações acima, foi possível obter uma purificação parcial das enzimas PME e PG de G088, pela adição de sulfato de amônio no sobrenadante remanescente da etapa de extração enzimática, com um

rendimento final de 108,74% para PME e 10,55% para PG e com um índice de purificação de 14,24 e 1,39, respectivamente.

Siessere (1991) separou as enzimas pectinolíticas de *Penicillium frequentans* presentes nos filtrados das culturas por cromatografia em coluna DEAE- Sephacel. As maiores recuperações de PG ocorreram nos picos 3 (24,93%) e 4 (28,16%) com índice de purificação igual a 1,95 e 2,14, respectivamente. Quanto a enzima PME, esta foi recuperada principalmente nos picos 1 e 2, com um rendimento de 37,88% e 31,26%, além de um índice de purificação iguais à 1,62 e 1,36.

Chelegatti et al. (2002) cultivaram *Penicillium frequentans* em meio líquido e purificaram a enzima PG por filtração e diálise, seguida de cromatografia, obtendo-se um índice de purificação final de 4,95.

Celestino et al. (2006) purificou as pectinases obtidas de culturas em estado líquido, através da combinação de uma ultrafiltração e procedimentos cromatográficos. O maior índice de purificação encontrado foi 9,37, com uma porcentagem de recuperação de 60,62%.

De acordo com os resultados dos autores citados acima, nota-se que foi possível obter uma purificação enzimática parcial das pectinases em estudo, pois comparando-se os resultados obtidos com outros onde obteve-se uma purificação enzimática total (através de etapas cromatográficas), nota-se que o rendimento e índice de purificação obtidos nesse experimento foram expressivos. No entanto, isso poderá ser corrigido empregando-se novas etapas no processo de purificação de pectinases oriundas de G088.

Os resultados indicam que existe a necessidade de otimizar as condições de cultivo e de extração das enzimas PME e PG de G088, sendo uma alternativa para se obter a enzima em maior concentração. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se afirmar que o AB G088 é um produtor de pectinases, pois cresceu facilmente em substrato semi-sólido, não necessitando

de suplementação de nutrientes, além de apresentar elevadas concentrações enzimáticas no extrato enzimático bruto, quando comparado com outros produtores enzimáticos comerciais.

## 5 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- A solução tampão benzoato pH 4,0 foi a melhor solução extratora para as enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase do agente biológico G088.
- Na etapa de extração enzimática, não foi possível obter uma separação enzimática total, ou seja, grande parte das enzimas continuaram aderidas a fração sólida do substrato;
- Supõe-se que as pectinases de G088, são enzimas intracelulares, necessitando de outros métodos de ruptura celular para obter a solução enzimática purificada.
- As pectinases do agente biológico G088 foram precipitadas com sulfato de amônio a 60% de saturação, em concentrações inferiores a esta não foi possível obter um precipitado enzimático.
- Com a precipitação enzimática foi possível aumentar o grau de pureza e a atividade específica da enzima pectinametilesterase, porém a enzima poligalacturonase apresentou maior grau de pureza após a etapa de extração enzimática.
- Através da metodologia empregada foi possível obter uma purificação enzimática parcial com índices de purificação expressivos quando comparados com outros estudos onde se obteve uma purificação enzimática total (através de etapas cromatográficas).
- O agente biológico G088 é um bom produtor de pectinases, pois cresceu facilmente em substrato semi-sólido, além de apresentar elevadas concentrações enzimáticas no extrato enzimático bruto.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Talvez uma boa separação das enzimas pectinolíticas de G088 possa ser obtida, em meio de cultivo apropriado mantendo as condições de pH e temperatura sob controle, seguido de um processo de purificação enzimática aperfeiçoado, considerando-se que as enzimas em estudo possam ser intracelulares e assim novas etapas devem ser aderidas nesse processo de recuperação enzimática.

De acordo com Lima et al. (2001), após a obtenção da biomassa (pellet), por centrifugação do extrato enzimático contendo enzimas intracelulares, esta deve ser lavada e as células rompidas para a liberação da enzima para o meio de extração. Diversas técnicas podem ser empregadas nessa operação: agitação com abrasivos, extrusão sólida e líquida, ultrassom, congelamento-descongelamento, choque osmótico, enzimas hidrolíticas de parede, tratamento alcalino e uso de detergentes e solventes. Após a extração da enzima intracelular, os procedimentos posteriores de purificação não mais se diferem das enzimas extracelulares.

Tendo em vista a crescente utilização de enzimas fúngicas na indústria e ao incentivo na utilização de microorganismos que se desenvolvem naturalmente em resíduos industriais, é necessário aprofundar e aperfeiçoar os estudos relacionados ao agente biológico G088 produtor de pectinases (pectinametilesterase e poligalacturonase).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 15. ed. Washington, 1990. 1117 p.

BAILEY, M. J.; PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme Microbial Technology**, Woburn, v. 12, n. 4, p. 266-271, Apr. 1990.

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

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. **Métodos de Laboratório em Bioquímica**. Barueri, SP: Manole, 2003. cap. 7 e 8.

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

BUESCHER, R. W.; FURMANSKI, R. J. Role of pectinesterase and polygalac in the formation of woolliness in peches. **Journal of Food Science**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 264-266, 1978.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agro-industrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 71, n. 1, p. 45-50, Jan. 2000.

CELESTINO, S. M. C.; FREITAS, S. M.; MEDRANO, F. J.; SOUZA, M. V.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 33-42, May 2006.

CHELLEGATTI, M. A. S. C.; FONSECA, M. J. V.; SAID, S. Purification and partial characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium frequentans*. **Microbiological Research**, Jena, v. 157, n. 1, p. 19-24, 2002.

COELHO, M. A. Z.; MEDRONHO, R. A.; LEITE, S. G. F.; COURI, S. Partial purification of a polygalacturonase produced by solid state cultures of *Aspergillus niger* 3T5B8. **Revista Brasileira de Microbiologia**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 318-322, out./dez. 1995.

CONWAY, W. S.; GROSS, K. C.; BOYER, C. D.; SAMS, C. E. Inhibition of *Penicillium expansum* polygalacturonase activity by increased apple cell wall calcium. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, n. 8, p. 1052-1055, Aug. 1988.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA PARA A SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., São Carlos, 2000. Universidade de São Carlos, 2000. p. 255-258.

GARZÓN, C. G.; HOURS, R. A. Citrus waste: An alternative substrate for pectinase production in solid state culture. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 93-95, 1992.

GEOCZE, M. L. A. **Efeitos de extrato de levedura, pH e outros fatores sobre a poligalacturonase de *Penicillium expansum***. 1994. 54 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases- a review. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 987-996, Feb. 2003.

ILLANES, A. **Biotecnología de enzimas**, Valparaiso: Editora de la Universidad Católica de Valparaiso, 1994.

JEN, J. J.; ROBINSON, M. L. P. Pectinolytic enzymes in sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Food Science**, Oxford, v. 49, p. 1045-1087, 1984.

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.

KULA, M. R. Enzymes, In: **Fundamentals of biotechnology**, 1987.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases-a review. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 987-996, Feb. 2002.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. cap. 14 e 15.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 693-702, Sept./Oct. 2004.

MARTIN, N.; SOUZA, S. R.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 813-819, Sept./Oct. 2004.

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA 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.

MIRANDA, R. P. **Purificação parcial e caracterização de Poligalacturonase de *Penicillium expansum***. 1997. 53 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

NELSON, N. A photometric adaptation os Somogyi method for determination of glicose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 135, n. 1, p. 136-175, Jan. 1944.

NITURE, S. K.; PANT, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid médium by a strain of *Fusarium Moniliforme*. **Microbial Research**, Jena, v. 159, n. 3, p. 305-314, 2004.

PARDO, C.; LAPENA, M. A.; GACTO, M. Purification and characterization of an extracelular exopolygalacturonase from *Geotrichum lactis*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 37, n. 12, p. 974-977, Dec. 1991.

PATIL, S. R.; DAYANAND, A. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 97, n. 18, p. 2340-2344, Dec. 2006.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: ESALQ, 1990. 468 p.

PHUTELA, U.; DHUNA, V.; SANDHU, S. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 1, p. 63-69, Jan./Mar. 2005.

PRESSEY, R.; AVANTS, J. K. Separation and characterization the escopolygalacturonase and indopolyg from peches. **Plant Physiology**, Rockville, v. 52, p. 252-256, 1973.

R Development Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2006. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 2006

SHEEN, Z.; MANNING, G.; REESE, J. C.; REECK, G. R. Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.): Purification and characterization. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, p. 209-214, 1999.

SHEN, Z.; REESE, J. C.; REECK, G. R. Purification and Characterization of Polygalacturonase from the *Rice Weevil*, *Sitophilus oryzae*. **Insect Biochemical Molecula Biology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 427-433, Mar. 1996.

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

SIÉSSERE, V. **Otimização das Condições de Cultivo para Produção e Caracterização parcial das enzimas pectinolíticas de *Penicillium frequentans***. 1991. 118 p. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

SILVA, D.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 318-324, Oct./Dec. 2002.

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

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**, 2. ed. Londres: John Wiley, 1995.

## ANEXOS

### ANEXO A

		<b>Página</b>
TABELA 1A	Resumo da Análise de variância dos resultados de Atividades PME e PG para o ensaio da avaliação da produção enzimática em três diferentes tempos de cultivos em dias.....	98
TABELA 2A	Resumo da Análise de variância do resultado de Atividade (PME) para o ensaio com 7 tipos de combinação de substrato e tampão.....	98
TABELA 3A	Resumo da Análise de variância do resultado de Atividade (PG) para o ensaio com 11 tipos de combinação de substrato e tampão.....	99
TABELA 4A	Resumo da Análise de variância de 4 contrastes da Atividade (PG) para o ensaio com 11 tipos de combinação de substrato e tampão.....	99
TABELA 5A	Resumo da Análise de variância dos resultados de Atividades PME e PG para o ensaio com 3 níveis de saturação.....	100

TABELA 1A. Resumo da Análise de variância dos resultados de Atividades PME e PG para o ensaio da avaliação da produção enzimática em três diferentes tempos de cultivos em dias.

Fonte de Variação	G.l.	Quadrado Médio	
		Atividade (PME)	Atividade (PG)
Tratamentos	2	1.469.066,6667 **	17.303,4878**
Resíduo	15	12.817,7778	177,0549
Total	17		
Média Geral		926,6667	74,8215
C.V (%)		12,22	4,59

(\*\*) significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 2A. Resumo da Análise de variância do resultado de Atividade (PME) para o ensaio com 7 tipos de combinação de substrato e tampão.

Fonte de Variação	G.l.	Quadrado Médio
		Atividade (PME)
Tratamentos	3	6.331.224,4431 **
Resíduo	20	8.540,8168
Total	23	
Média Geral		1.821,4286
C.V (%)		5,07

(\*\*) significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

TABELA 3A. Resumo da Análise de variância do resultado de Atividade (PG) para o ensaio com 11 tipos de combinação de substrato e tampão.

Fonte de Variação	G.l.	Quadrado Médio Atividade (PG)
Tratamentos	7	12.572,5357 **
Resíduo	40	4,9609
Total	47	
Média Geral		53,2091
C.V (%)		4,96

(\*\*) significativo a 1% de probabilidade pelo teste F

TABELA 4A. Resumo da Análise de variância de 4 contrastes da Atividade (PG) para o ensaio com 11 tipos de combinação de substrato e tampão.

Fonte de Variação	G.l.	Quadrado Médio Atividade (PG)
Contraste 1	1	54.604,6287**
Contraste 2	1	802,6956**
Contraste 3	1	838,2984**
Contraste 4	1	45.839,2481**
Resíduo	40	4,9609

(\*\*) significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Contrate 1:  $Y_1=2BP-BS1-BS2=116,83$

Contrate 2:  $Y_2=2BS1-CS1-FS1=14,16$

Contrate 3:  $Y_3=2BS2-CS2-FS2=14,48$

Contrate 4:  $Y_4=BP-CP=123,61$



TABELA 5A. Resumo da Análise de variância dos resultados de Atividades PME e PG para o ensaio com 3 níveis de saturação.

Fonte de Variação	G.l.	Quadrado Médio	
		Atividade (PME)	Atividade (PG)
Tratamentos	2	1.940.510,0230 **	91,3163**
Resíduo	15	6.795,9153	0,1313
Total	17		
Média Geral		907,1428	7,2322
C.V (%)		9,09	5,01

(\*\*) significativo a 1% de probabilidade pelo teste F