



SABRINA CARVALHO BASTOS

**Pectinases de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.)
de Vries: condições de cultivo, purificação parcial e
caracterização**

LAVRAS – MG

2012

SABRINA CARVALHO BASTOS

Pectinases de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries: condições de cultivo, purificação parcial e caracterização

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

Orientador

Dr. Carlos José Pimenta

LAVRAS – MG

2012

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

Bastos, Sabrina Carvalho.

Pectinases de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries:
condições de cultivo, purificação parcial e caracterização / Sabrina
Carvalho Bastos. – Lavras : UFLA, 2012.

133 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Carlos José Pimenta.

Bibliografia.

1. Pectinametilesterase. 2. Exo-poligalacturonase. 3. Endo-
poligalacturonase. 4. Pectina liase. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 664.024

SABRINA CARVALHO BASTOS

Pectinases de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries: condições de cultivo, purificação parcial e caracterização

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

APROVADA em 4 de maio de 2012.

Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA
Dra. Sara Maria Shalfoun de Souza	UFLA
Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Dra. Patrícia de Fátima Pereira Goulart	UNILAVRAS

Orientador

Dr. Carlos José Pimenta

LAVRAS – MG

2012

DEDICATÓRIA

A DEUS,

Aos meus estimados familiares e amigos.

Ao Juliano e Alice,

pelo incentivo, amor e apoio incondicional.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos pela oportunidade concedida para realização deste projeto de pesquisa.

Ao professor Dr. Carlos José Pimenta pela orientação, amizade e confiança. Também tenho imensa gratidão pelas oportunidades concedidas além deste projeto de pesquisa, as quais foram e continuam sendo de grande relevância para meu crescimento profissional.

Ao professor Dr. Disney Ribeiro Dias pelo imprescindível apoio na realização das análises laboratoriais e também pela atenção, sugestões e amizade.

À professora Dra. Sara Maria Shalfoun de Souza pela sabedoria compartilhada, serenidade e oportunidade de desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Dr. Cleiton Antônio Nunes pela gentileza em prestar auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Ciência dos Alimentos pelos conhecimentos transmitidos e amizade compartilhada.

Ao Departamento de Biologia, em especial a equipe do Laboratório de Enzimas, pelo espaço concedido e apoio na realização das análises laboratoriais.

A todos os professores, que pela nobre ação de compartilhar conhecimento, tanto contribuíram em minha jornada acadêmica.

A todos os colegas da UFLA pela harmoniosa convivência.

Enfim, a todos que estiveram ao meu lado e de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO GERAL

O trabalho objetivou otimizar as condições de cultivo do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, purificar parcialmente as pectinases sintetizadas e caracterizá-las quanto as suas condições de estabilidade. O fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries foi cultivado em condições submersas específicas para avaliar os efeitos do tempo de incubação (24 a 120 horas), pH inicial (3,5 a 6,5) e concentração de pectina (5 a 20g/L) sobre a síntese de pectina liase (PL), pectinametilesterase (PME), exo-poligalacturonase (exo-PG) e endo-poligalacturonase (endo-PG). Através do planejamento experimental por DCCR, foi possível otimizar as condições de cultivo e obter um aumento significativo na atividade das pectinases em estudo. A condição de fermentação que resultou em produção máxima de PL (7000 U/mg), exo-PG (1 U/mg) e endo-PG (40U/mg) foi pH inferior a 3,5, concentrações de pectina superior a 16g/L e tempo de cultivo menor que 40 horas. Estas enzimas, produzidas nas condições otimizadas, foram parcialmente purificadas utilizando sulfato de amônio a 60% e posterior diálise. Foi possível obter índices de purificação significativos equivalentes a 8,1; 7,6; 7,8 e 8,4, para PL, PME, exo-PG e endo-PG, respectivamente. A porcentagem de recuperação destas enzimas com o processo de purificação foi superior a 90%. As enzimas parcialmente purificadas foram caracterizadas quanto a estabilidade em relação ao pH (4,0 a 8,0), temperatura (30 a 70°C) e tempo de incubação (43 a 107 horas). O pH e a temperatura tiveram efeito negativo sobre a estabilidade de todas as pectinases, em contrapartida, o tempo não influenciou na resposta enzimática. A estabilidade das enzimas PL, PME, exo-PG e endo-PG foi máxima em pH ácido, entre 3,5 a 5,0 e temperatura entre 25 a 35°C. Nestas condições, foi possível reter aproximadamente 95% da atividade enzimática inicial. Também foi possível reter 80% da atividade inicial das pectinases em pH alcalino (8.0) associado a uma temperatura de até 30°C.

Palavras-chave: Pectina liase. Pectinametilesterase. Exo-poligalacturonase. Endo-poligalacturonase.

GENERAL ABSTRACT

The work aimed at optimizing the growing conditions of the fungus *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, partially purify pectinases synthesized and characterized them as their conditions of stability. The fungus *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries was cultivated under specific submersed conditions to evaluate the effects of incubation time (24 to 120 hours), initial pH (3.5 to 6.5) and pectin concentration (5 to 20g/L) upon the synthesis of pectin lyase (PL), pectinmethylesterase (PME), exo-polygalacturonase (exo-PG) and endo-polygalacturonase (endo-PG). Through the experimental planning by DCCR, it was possible to optimize the cultivation conditions and obtain a significant increase in the activity of the pectinases under study. The fermentation condition which resulted into maximum production of PL (7000 U/mg), exo-PG (1 U/mg) and endo-PG (40U/mg) was pH lower than 3.5, pectin concentrations higher than 16g/L and cultivation time shorter than 40 hours. These enzymes, produced in the optimized conditions, were practically purified by using 60% ammonium sulfate and further dialysis. It was possible to obtain significant purification indices equivalent to 8.1; 7.6; 7.8 and 8.4 for PL, PME, exo-PG and endo-PG, respectively. The recovery percentage of these enzymes with the purification process was higher than 90%. The partially purified enzymes were characterized as to the stability in relation to pH (4.0 to 8.0), temperature (30 to 70°C) and incubation time (43 to 107 hours). Both pH and temperature had negative effect upon the stability of all the pectinases, on the other hand, time did not influence the enzyme response. The stability of the enzymes PL, PME, exo-PG and endo-PG was maximal at acidic pH, between 3.5 to 5.0 and temperature between 25 to 35°C. Under these conditions, it was possible to retain about 95% of the initial enzyme activity. It was also possible to retain 80% of the initial activity of pectinases at alkaline pH (8.0) associate with a temperature of up to 30°C.

Keywords: Pectinmetilesterase. Pectin lyase. Exo-polygalacturonase. Endo-polygalacturonase.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1: Introdução Geral.....	10
1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Substâncias pécicas.....	13
2.2	Enzimas pectinolíticas: classificação e mecanismo de ação.....	17
2.3	Enzimas pectinolíticas e potencial industrial.....	22
2.4	Influência das condições de cultivo sobre a produção de pectinases.....	27
2.4.1	Influência do pH do meio de cultivo sobre a síntese de pectinases.....	30
2.4.2	Influência do tempo de cultivo sobre a síntese de pectinases.....	31
2.4.3	Influência da composição do meio de cultivo sobre a síntese de pectinases.....	33
2.5	Extração e purificação de pectinases	35
2.6	Influência do pH e temperatura sobre a estabilidade de pectinases.....	39
	REFERÊNCIAS.....	42
	CAPÍTULO 2: Production of Pectinases by <i>Cladosporium cladosporioides</i> (fres. de Vries): Influence of Fermentation Conditions.....	53
1	INTRODUÇÃO.....	55
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1	Instalação do experimento.....	57
2.2	Microrganismo utilizado e condições de cultivo.....	57
2.3	Delineamento experimental.....	58
2.4	Obtenção do extrato enzimático bruto e determinação das atividades enzimáticas.....	59
2.4.1	Pectinametilesterase (PME).....	60
2.4.2	Pectina liase (PL).....	61
2.4.3	Exo-poligalacturonase (Exo-PG).....	61
2.4.4	Endo-poligalacturonase (Endo-PG).....	62
2.4.5	Proteínas totais e Atividade enzimática específica.....	63
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	80
	CAPÍTULO 3: Extração e purificação parcial de pectinases obtidas de <i>Cladosporium cladosporioides</i> (fres. de Vries).....	83

1	INTRODUÇÃO.....	85
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	87
2.1	Instalação do experimento.....	87
2.2	Microrganismo utilizado e condições de cultivo.....	87
2.3	Obtenção do extrato enzimático bruto.....	88
2.4	Precipitação enzimática.....	89
2.5	Diálise da solução enzimática.....	90
2.6	Determinação da Atividade Enzimática.....	91
2.6.1	Pectinametilesterase (PME).....	91
2.6.2	Pectina liase (PL).....	92
2.6.3	Exo-poligalacturonase (Exo-PG).....	92
2.6.4	Endo-poligalacturonase (Endo-PG).....	93
2.7	Proteínas totais e atividade enzimática específica.....	94
2.8	Cálculo do rendimento e índice de purificação.....	94
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
4	CONCLUSÃO.....	104
	REFERÊNCIAS.....	105
	CAPÍTULO 4: Características de estabilidade de pectinases obtidas de <i>Cladosporium cladosporioides</i> (fres. de Vries).....	109
1	INTRODUÇÃO.....	111
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	113
2.1	Instalação do experimento.....	113
2.2	Delineamento experimental para a caracterização da estabilidade das enzimas PME, PL, exo-PG e endo-PG	113
2.3	Determinação das atividades enzimáticas.....	115
2.3.1	Pectinametilesterase (PME).....	115
2.3.2	Pectina liase (PL).....	116
2.3.3	Exo-poligalacturonase (Exo-PG).....	116
2.3.4	Endo-poligalacturonase (Endo-PG).....	117
2.4	Proteínas totais e atividade enzimática específica.....	118
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	119
4	CONCLUSÃO.....	129
5	PERSPECTIVAS	130
	REFERÊNCIAS.....	131

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O mercado de enzimas destinadas ao processamento de alimentos tem crescido nos últimos anos. Diversas companhias na Europa, Estados Unidos e no Japão produzem preparações comerciais de pectinases (UENOJO; PASTORE, 2007). Jayani, Saxena e Gupta (2005) citam que do total das enzimas comercializadas, 25% correspondem à venda de pectinases de origem microbiana.

A maior parte destas pectinases é vendida para a indústria de sucos de frutas, sendo utilizadas com êxito no processo de extração, clarificação e redução da viscosidade de sucos (HEERD et al., 2012). Outras aplicações destas enzimas na indústria de alimentos incluem amadurecimento de frutas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, extração de óleos vegetais e produção de alimentos para bebês. Podem também ser utilizadas na indústria de fermentados, como, por exemplo, na fermentação do cacau, café e fumo, e na degomagem de fibras naturais na indústria têxtil e de papel (NIGHOJKAR et al., 2006; UENOJO; PASTORE, 2007; USTOK; TARI; GOGUS, 2007).

Conforme relatado anteriormente, são inúmeras as aplicações das pectinases e seu mecanismo de ação baseia-se na decomposição do heteropolissacarídeo pectina, presente na lamela média e na parede celular primária de plantas superiores (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; WILLATS et al., 2001). As pectinases comerciais, destinadas ao uso na indústria de alimentos, são uma mistura de enzimas composta principalmente de

poligalacturonase (PG), pectina liase (PL) e pectinametilesterase (PME), além de outras enzimas celulolíticas e proteolíticas (HEERD et al., 2012).

Um grande número de microrganismos produz enzimas pectinolíticas. Os fungos filamentosos especialmente *Aspergillus niger* (A. niger), são os principais produtores de pectinases usadas nas indústrias de sucos de frutas e produção de vinho (KASHYAP et al., 2001). As pesquisas que envolvem outros microrganismos produtores de pectinases com potencial industrial estão sendo incentivadas na tentativa de aumentar a produção nacional de pectinases comerciais de custo reduzido, destinadas à indústria alimentícia (CARDOSO et al., 2007; MALVESSI; SILVEIRA, 2004; PERICIN, 2007; PHUTELA et al., 2005; SILVA et al., 2002).

A produção de pectinases por microrganismos é influenciada pelas condições de cultivo, a qual pode estimular ou inibir a liberação de enzimas (VISWANATHAN; JAGADEESHBABU, 2008). Assim, ao estudar um novo microrganismo produtor de pectinases, o primeiro passo é a otimização das condições de cultivo, ou seja, conhecer os diversos aspectos que regulam a síntese e a atividade da enzima (CORDEIRO; MARTINS, 2009).

Após conhecer a condição de cultivo que resulta em maiores níveis de atividade enzimática, é necessário isolar e caracterizar estas enzimas quanto a sua estabilidade, para posterior definição de suas possíveis aplicações industriais. As pesquisas relacionadas à produção, purificação e caracterização de enzimas pectinolíticas, estão sendo um destaque no setor biotecnológico (GUMMADI; PANDA, 2003). Diferentes procedimentos para isolamento e purificação de enzimas estão sendo propostos e o desafio é selecionar o processo de purificação mais conveniente (economicamente e tecnologicamente), visando obter um produto livre de interferentes, porém sem alterações de suas características funcionais. A caracterização de enzimas purificadas é uma etapa

preliminar a sua aplicação industrial, pois fornece informações sobre a estabilidade da enzima e seu potencial de ação em diferentes condições de processamentos industriais.

Nesse sentido, este trabalho teve o objetivo de otimizar as condições de cultivo do microrganismo *Cladosporium cladosporioide* (Fres.) de Vries, considerado em estudos anteriores como bom produtor de pectinases, por ser estável, não patogênico e possuir um crescimento rápido e vigoroso. Após otimizar as condições de cultivo as enzimas pectinametilesterase, pectina liase, exo-poligalacturonase e endo-poligalacturonase foram parcialmente purificadas e avaliadas quanto à sua estabilidade em diferentes faixas de pH, temperatura e tempo de armazenamento. Este estudo também objetiva disponibilizar para o setor industrial enzimas pécnicas com elevado potencial de ação e com baixo custo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Substâncias pécnicas

As substâncias pécnicas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular e alta complexidade, encontrada em vegetais superiores. Formam a parede celular primária e são os principais componentes da lamela média, uma fina camada de material adesivo extracelular entre as paredes primárias de células vegetais jovens (ALKORTA et al., 1998; ALMEIDA et al., 2005; ROMBOUTS; PILNIK, 1980). As substâncias pécnicas são responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos vegetais e participam da organização estrutural dos outros componentes da parede celular (Figura 1), tais como celulose e hemicelulose (CASTILHO; MEDRONHO; ALVES, 2000; VRIES; VISSER, 2001).

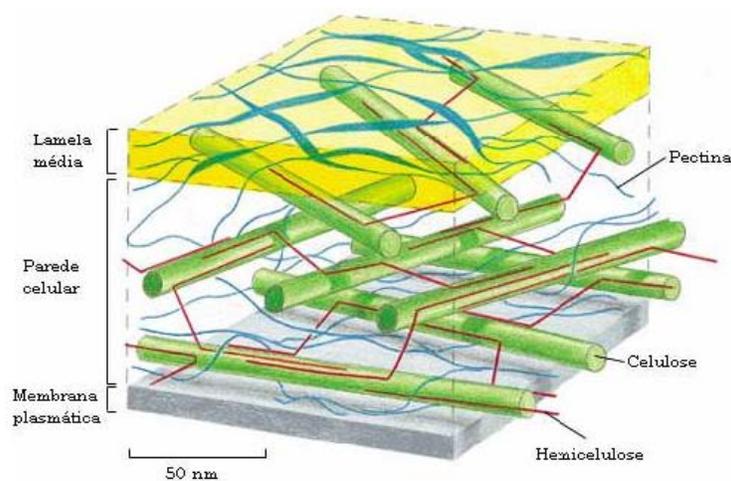


Figura 1 Parede celular vegetal, contendo as moléculas de pectina
FONTE: Martins (2006)

Os polímeros pécticos estão relacionados diretamente a resistência e a porosidade da parede celular. Outras funções desempenhadas por esses polissacarídeos são adesão celular, controle do transito de macromoléculas, hidratação, plasticidade e flexibilidade durante o crescimento da célula (WILLATS et al., 2001). Também são responsáveis pelas diferenças de textura de frutas e vegetais durante o seu crescimento, amadurecimento e armazenamento (MARTINS, 2006; SILVA et al., 2005).

Quimicamente as substâncias pécticas consistem em polissacarídeos ácidos coloidais complexos, com uma cadeia principal composta de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligação α 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). 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; UENOJO; PASTORE, 2007).

O grau de esterificação, o grau de polimerização, a proporção de açúcares neutros e o peso molecular, são os principais fatores de heterogeneidade entre as substâncias pécticas de diferentes origens. Isso torna improvável a existência de moléculas de pectinas idênticas (RIDLEY; O'NEILL; MOHNEN, 2001).

Apesar da estrutura da molécula de pectina ser diferente entre os tecidos vegetais e da dificuldade em representá-la através de uma única estrutura, pesquisas recentes mostram que na parede celular vegetal, quatro polissacarídeos pécticos podem ser identificados, todos eles contendo ácido galacturônico em maior ou menor proporção (NITURE, 2008). Estes polissacarídeos são representados pela homogalacturonana (HGA), ramnogalacturonana I (RGI),

ramnogalacturonana II (RGII) e xilogalacturonana (XGA) (SCHELLER et al., 2007; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006). Aparentemente, esses polímeros são covalentemente ligados uns aos outros. A Figura 2 ilustra o modelo atual para a estrutura da pectina.

A região HGA é formada predominantemente por unidades de α -D-ácidos galacturônicos unidos por ligação 1 \rightarrow 4. O ácido galacturônico pode estar esterificado com grupamento metil. Diferentes graus de esterificação podem ser apresentados pela HG: totalmente metil-esterificada (protopectina), parcialmente metil-esterificada (ácido pectínico) ou isenta de metilação (ácido pectico ou poligalacturônico). Frequentemente utiliza-se o termo pectina para designar qualquer um dos três tipos de substâncias pecticas (KASHYAP et al., 2000; LANG; DÖRNENBURG, 2000; NAIDU; PANDA, 1998; ROMBOUITS; PILNIK, 1980; SAKAI et al., 1993; WHITAKER, 1994).

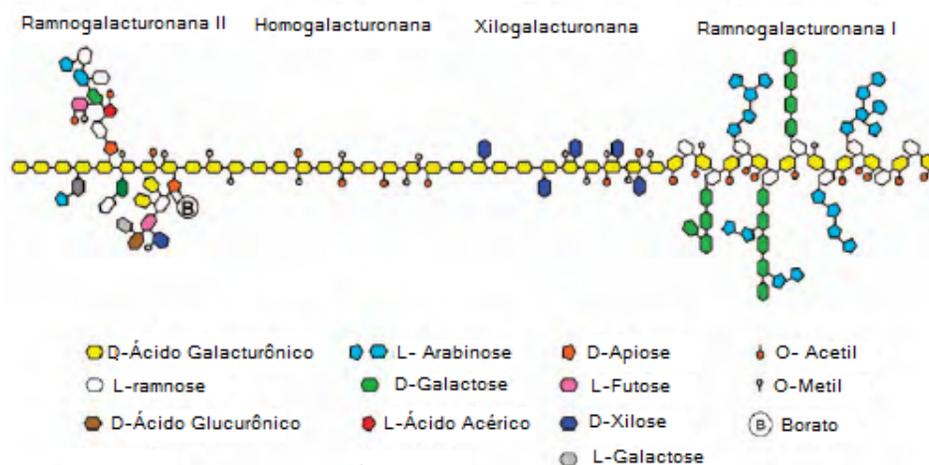


Figura 2 Estrutura básica da pectina
Fonte: Adaptada de Scheller et al. (2007)

Na região RGI, a cadeia principal contém unidades repetidas do dissacarídeo [1→4)- α -D-GalA-(1→2)- α -L-Rha-(1→4] para que uma variedade de diferentes cadeias de gliconas (principalmente galactose e arabinose) fiquem presas aos resíduos de Rha.

A fração RGII é formada por polissacarídeos complexos com altas proporções de ramnose e açúcares raros como 2-O-metil-fucose, 2-O-metil-xilose, apinose. A cadeia principal é composta de unidades de α -D-ácidos galacturônicos em ligações (1→4).

A região xilogalacturonana, XGA, apresenta a cadeia principal composta por unidades de α -D-ácidos galacturônicos (1→4) e contendo cadeia lateral de 1,3- β -D-xilose. O ácido galacturônico da xilogalacturonana (XGA) pode ser esterificado com o grupamento metil (SCHOLS et al., 1995; VISSER; VORAGEN, 1996; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

Nos frutos verdes a pectina encontra-se em sua forma insolúvel (protopectina), associada a microfibrilas de celulose, o que confere rigidez à parede celular. Durante o amadurecimento, enzimas presentes no fruto alteram a estrutura da pectina tornando-a mais solúvel. Tais alterações envolvem quebra da cadeia da pectina ou das cadeias laterais (KASHYAP et al., 2001).

Pectina e polissacarídeos pécticos estão sendo considerados alimentos bioativos. Substâncias pécticas são usadas no setor farmacêutico como agentes desintoxicantes, e são bem conhecidas por seu efeito antidiarréico. Na indústria de alimentos atuam como agentes geleificantes e como fibras nutricionais. Por outro lado, podem representar um problema nas várias etapas do processamento de frutas e vegetais, visto que seu arraste, após o rompimento da parede celular, pode causar turbidez em sucos ou incrustações em tubulações e reatores industriais (LANG; DÖRNENBURG, 2000).

A ação coloidal da pectina dificulta o processo de fabricação dos sucos, pois a turvação dificilmente pode ser removida apenas por filtração devido a grande quantidade de partículas em suspensão. Quando tratados previamente por pectinases, os sucos são facilmente clarificados e filtrados obtendo uma bebida com maiores rendimentos e estável (BARROS; MENDES; PERES, 2004).

2.2 Enzimas pectinolíticas: classificação e mecanismo de ação

As pectinases constituem um grupo heterogêneo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécticas, através de reações de despolimerização (hidrolases e liases) e desesterificação (esterases) (SILVA et al., 2005). Podem ser produzidas, em diferentes combinações, por plantas e microrganismos, como fungos, leveduras e bactérias, a fim de degradar (para obter fonte de carbono) ou para modificar (fruto em amadurecimento) o heteropolissacarídeo pectina (VRIES et al., 2000).

As pectinases microbianas respondem por 25% das vendas de enzimas para alimentos (SILVA et al., 2005). São empregadas em nível industrial destacando-se por serem as enzimas mais utilizadas pelas indústrias de processamento de frutas (HENNIES, 1996).

A classificação das enzimas pécticas é baseada no modo de ataque à molécula de pectina. Conforme ilustra a Figura 3, a grande maioria das pectinases degrada a cadeia de Homogalacturonana da pectina (VRIES et al., 2002).

Existem basicamente três tipos de pectinases: pectina esterase (desesterificante ou desmetoxilante) remove os grupos metil éster; as despolimerizantes (incluem as enzimas hidrolíticas e as liases) catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécticas e, as protopectinases

que solubilizam protopectina para formar pectina (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; SAKAI et al., 1993; WHITAKER, 1990).

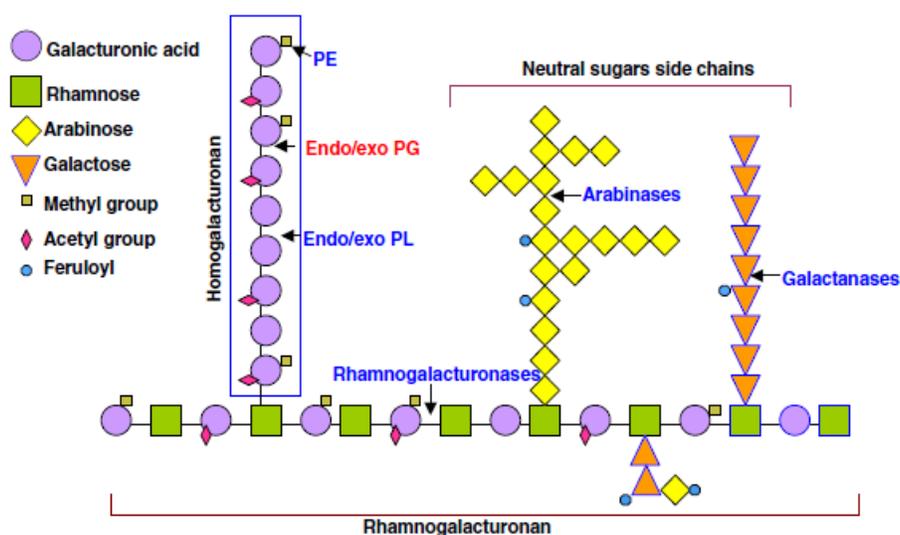


Figura 3 Diagrama representativo dos componentes da molécula de pectina e dos sítios de clivagem
 Fonte: Vincken et al. (2003)

Protopectinases: catalisam a hidrólise da protopectina, originando ácido pécico e pectina, diminuindo a rigidez da parede celular durante o amolecimento e o amadurecimento (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; KASHYAP et al., 2001). Não são muito abundantes e possuem pouco interesse industrial na degradação da pectina (ALKORTA et al., 1998).

Existem dois tipos de protopectinases (PPases), o tipo A faz a clivagem na parte interna da molécula do ácido poligalacturônico da protopectina enquanto o tipo B nas cadeias de polissacarídeos que podem estar conectados à

cadeia de ácido poligalacturônico e constituintes da parede celular (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Enzimas desmetoxilante ou desesterificante: é representada pela enzima pectinametilesterase (PME), também conhecida como pectinesterase, pectase e pectina metoxilase. Essa enzima catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, liberando metanol e convertendo pectina em pectato ou ácido péctico, polímero não esterificado (GUMMADI; PANDA, 2003; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; MAYANS et al., 1997; WHITAKER, 1990). Durante a reação ocorre a quebra da molécula da água e a adição de um hidrogênio a um carbono da ligação e adição do grupo hidroxila a outro carbono, produzindo metanol e pectina com baixo grau de metoxilação (KASHYAP et al., 2001). A desesterificação da pectina ocorre linearmente ao longo da molécula, por mecanismo em cadeia simples (UENOJO; PASTORE, 2007).

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, ambas necessitam de substrato não esterificado. As pectinesterases (PME) estão presentes em praticamente todos os preparados comerciais de enzimas e apresentam valores de pH ótimo variando de 4 a 8 e temperatura ótima de 40 a 50 °C (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Enzimas despolimerizantes: em complemento às enzimas desesterificantes (pectinametilesterase), as despolimerases promovem a clivagem de ligações glicosídicas α - (1,4) e são classificadas conforme a especificidade da enzima pelo substrato (pectina ou ácido péctico); a posição de clivagem na cadeia principal das substâncias pécticas, atuação ao acaso (endoenzima) ou a partir da extremidade redutora ou não redutora do substrato (exoenzima) e o mecanismo de reação de despolimerização (clivagem por β -

eliminação ou hidrólise do substrato). Envolvem as **hidrolases** (catalisam a hidrólise de ligações α -1,4) e as **liases** (catalisam a β -eliminação) (ALKORTA et al., 1998; GAINVORS et al., 1994).

As hidrolases catalisam a quebra da ligação glicosídica pela introdução de água, enquanto as liases quebram a ligação glicosídica por reação de transeliminação do H, formando dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 do ácido galacturônico.

São classificadas como **hidrolases** as **polimetilgalacturonases** e as **poligalacturonases**, podendo apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise seqüencial a partir do final da molécula).

A **polimetilgalacturonase** (PMG) catalisa a clivagem hidrolítica da ligação glicosídica α -1,4 de polimetilgalacturonatos. Atua sobre a molécula de pectina altamente esterificada (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Apesar de ser citada em algumas literaturas, sua existência é questionada por alguns autores (SAKAI et al., 1993; UENOJO; PASTORE, 2007).

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. É a principal enzima com função hidrolítica, podendo apresentar ação endo-(hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise seqüencial) do ácido péctico (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; KASHYAP et al., 2001). As poligalacturonases fúngicas são úteis para a maioria dos usos industriais, principalmente o processamento de frutas e vegetais, devido a atividade ótima em pH levemente ácido e temperatura ótima entre 40 e 60 °C (PEDROLLI et al., 2009; SANTOS et al., 2008).

As poligalacturonases necessitam de grupos carboxílicos livres para a catálise. A presença de grupos metoxílicos na molécula de pectina pode inibir a atividade dessas enzimas (DINU, 2001).

As **liases**, também chamadas transeliminases, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado. São representadas principalmente pela **pectina liase** (PL) e **pectato liase** (PAL), as quais se diferem pelo substrato sobre o qual atuam (UENOJO; PASTORE, 2007). Ao contrário das poligalacturonases, estas enzimas despolimerizam a pectina com aproximadamente 65% – 98% de esterificação (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Pectina liase (PL) catalisa a clivagem da molécula de pectina altamente esterificada, através da transeliminação do hidrogênio das ligações glicosídicas dos carbonos 4 e 5 da porção aglicona do substrato (pectina) de modo endo ou exo (GAINVORS et al., 1994; KARAM; BELARBI, 1995; PEDROLI et al., 2009; WHITAKER, 1994). O pH ótimo é em torno de 5,5 e temperatura ótima entre 40 e 50 °C (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Pectato liase (poligalacturonato liase, PGL) catalisa a clivagem de ligações α -1,4 de ácido pécico, polímero não esterificado, formando um produto insaturado (4,5-D-galacturonato) por reação de transeliminação. Esta enzima é altamente dependente de íons Ca^+ . A enzima pectato liase são classificadas como endo, atuam sobre o substrato de forma randômica, ou exo, catalisam a clivagem do substrato a partir da extremidade não redutora. Estas enzimas possuem pH ótimo na região alcalina, entre 7,5 e 10 e temperatura ótima entre 40 e 50 °C (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; KASHYAP et al., 2001; PEDROLI et al., 2009; ROMBOUTS; PILNIK, 1980; SAKAI et al., 1993). A figura 4 representa o modo de ação das pectinases em uma molécula de pectina.

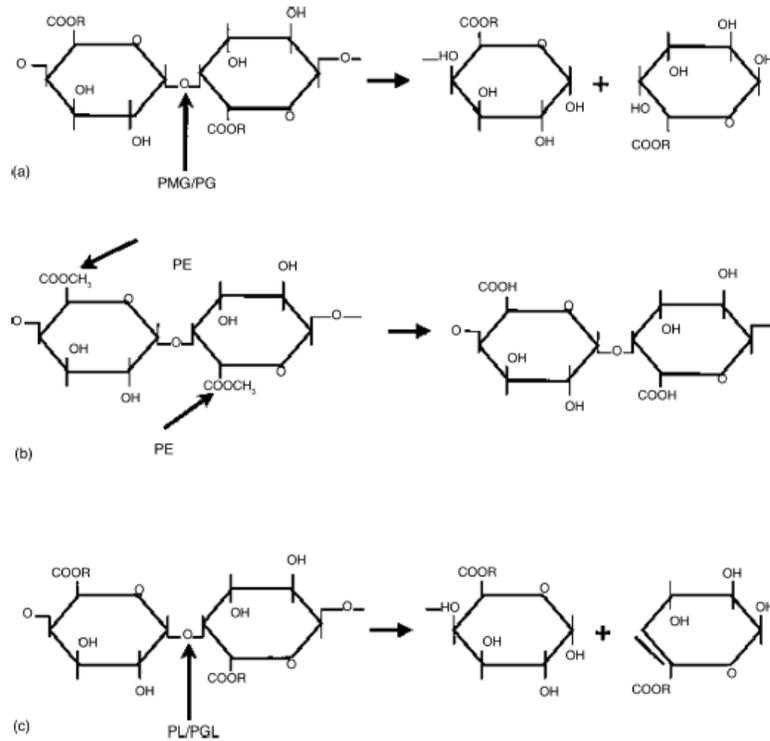


Figura 4 Modo de ação das pectinases: (a) R=H para PG e CH₃ para PMG; (b) PE; e (c) R=H para PGL e CH₃ para PL. As setas indicam o local de reação das enzimas nas substâncias pécnicas. PMG (polimetilgalacturonases); PG (poligalacturonases); PE (pectinesteases); PL (pectina liase)
 FONTE: Jayani, Saxena e Gupta (2005)

2.3 Enzimas pectinolíticas e potencial industrial

As pectinases estão entre as primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente nas preparações de vinhos e sucos de frutas ao redor de 1930. A partir de 1960, quando os estudos sobre a natureza química de tecidos vegetais se

tornaram mais aparentes, estas enzimas foram aplicadas mais eficientemente (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Durante as duas últimas décadas, o uso de pectinases tem aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias de alimentos, envolvendo o processamento de polpa de frutas e outras estruturas vegetais, a clarificação de sucos de frutas e de vinhos, o isolamento de óleos essenciais e pigmentos de cítricos, a produção de comida para bebês, como purês de frutas e legumes (HADJ-TAIEB et al., 2006; RAI; MAJUMDAR; GUPTA, 2004). Outros exemplos de aplicação de tais enzimas são na fabricação do papel, rações para animais, fermentação de café e chá (KASHYAP et al., 2001; VIKARI; TENAKANEN; SUURNAKKI, 2001).

Além das aplicações listadas acima, a infusão de pectinase e β -glicosidase aumenta o aroma e as substâncias voláteis de frutas e vegetais, aumenta a quantidade de agentes antioxidantes em óleo de oliva extra virgem e reduz a indução ao ranço (SEMENOVA et al., 2006).

Inúmeros trabalhos científicos relatam a utilização de pectinases em uma grande variedade de processos industriais. A produção e uso de enzimas, com destaque para as pectinases, tem se tornado uma área de grande interesse da indústria biotecnológica. Esta informação é comprovada pelo fato das pectinases representarem cerca de 10% das enzimas vendidas comercialmente, devido as suas inúmeras aplicações (PEDROLI et al., 2009).

Na base de suas aplicações, as pectinases são, principalmente, de dois tipos: pectinases ácidas e pectinases alcalinas. Para a extração e clarificação de sucos e vinhos têm sido utilizadas pectinases ácidas enquanto que para o tratamento de vegetais, em outros ramos da indústria alimentícia e para o processamento de fibras, como a juta, utiliza-se pectinases alcalinas (HOONDAL et al., 2002).

Pectinases ácidas são amplamente utilizadas na extração, clarificação e despectinização de sucos de fruta, maceração de vegetais para produção de pastas e purês e na fabricação de vinhos, sendo frequentemente produzidas por fungos, especialmente por *Aspergillus niger* (PEDROLLI et al., 2009).

Com a adição de pectinases é possível produzir uma extensa variedade de sucos e outros produtos alimentícios, incluindo: (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, resultando em produtos que podem ser usados como material base para sucos polposos e néctares. 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 a espremedura da fruta e filtração, para remover matéria suspensa, chegando a um suco claro e brilhante. São exemplos os sucos de uva, maçã, pêra, morango, framboesa, amora, dentre outros (UENOJO; PASTORE, 2007).

Segundo Pedrolli et al. (2009), o esmagamento de frutas ricas em pectina produz um suco com alta viscosidade, o qual permanece ligado à polpa na forma de uma massa gelatinizada. Isto dificulta a extração do suco de fruta por prensagem ou por outro método mecânico. Com a adição de pectinases, o suco de fruta é facilmente obtido e com maior rendimento. Além de melhorar o rendimento as pectinases agem desestabilizando as substâncias pécicas floculantes, provocando coagulação e precipitação, facilitando a filtração e resultando na clarificação do suco. As enzimas pécicas também desintegram a estrutura de gel da pectina e reduzem a viscosidade, facilitando a concentração

dos sucos e reduzindo em até 50% o tempo de filtração (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001).

A extração de sucos através da maceração enzimática pode produzir um aumento no rendimento acima de 90% se comparada ao processo mecânico convencional, além das melhorias nas características organolépticas (cor, sabor), nutritivas (vitaminas) e tecnológicas (melhor filtração) do suco. Também observa-se maior estabilidade, menor tempo de extração e um menor preço de produção, devido aos maiores rendimentos e um gasto menor com equipamentos e mão de obra (PEDROLLI et al., 2009).

Dentre as aplicações das enzimas pécticas destaca-se o seu uso no processamento do suco de uva e vinho para melhorar a maceração da casca e aumentar a extração de pigmentos da uva, além de facilitar a clarificação e a filtração do mosto, aumentando assim a qualidade e a estabilidade do vinho (UENOJO; PASTORE, 2007). De acordo com o estudo de Jayani, Saxena e Gupta (2005), quando as pectinases são adicionadas durante a maceração das uvas para produção de vinho tinto tem-se um melhoramento das características visuais (cor e turbidez), quando comparado com vinhos não tratados, apresentando características cromáticas consideradas melhores que os vinhos controle.

Enzimas pécticas contendo altos níveis de poligalacturonase, também são acrescentadas em alguns produtos a base de frutas para estabilizar o escurecimento de sucos cítricos, purês e néctares (turvos). Um bom exemplo é o suco de laranja. No processo de extração do suco das laranjas, pectinases também podem ser usadas em diferentes estágios permitindo uma melhor extração de açúcares e sólidos solúveis, resultando em maior rendimento e viscosidade mais baixa. Com o tratamento enzimático ocorre a degradação parcial da pectina insolúvel e com isso o produto torna-se estável. As

preparações enzimáticas devem apresentar pequenas concentrações de PME, para evitar a clarificação do suco. Em sucos não clarificados, como o de laranja, o tratamento térmico é uma etapa para a inativação da PME, a qual mantém a turbidez estável. O congelamento do produto também faz com que a enzima permaneça na sua forma inativa (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Ao contrário das pectinases ácidas, as *pectinases alcalinas* são, geralmente, produzidas por bactérias, principalmente *Bacillus* spp, sendo também sintetizadas, em menor escala, por alguns fungos e leveduras (HOONDAL et al., 2002; KAPOOR et al., 2001; KASHYAP et al., 2000; YADAV et al., 2008). No entanto, no presente estudo as pectinases obtidas do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries apresentaram estabilidade em condições ácidas e básicas desde que a temperatura não ultrapasse os 30°C. Estas pectinases alcalinas podem ser utilizadas no pré-tratamento de águas residuais provenientes das indústrias de processamento de alimentos vegetais, contendo material pectináceo; tratamento e degomagem de fibras naturais para a indústria têxtil e de papel; fermentação de café e chá; extração de óleos vegetais (AHLAWAT et al., 2009; HOONDAL et al., 2002; KAPOOR et al., 2001; KASHYAP et al., 2001; YADAV et al., 2008; ZHANG; HENRIKSSON; JOHANSSON, 2000).

As enzimas pécticas são utilizadas em associação a outras enzimas, tais como celulasas e hemicelulasas, chamadas coletivamente de enzimas de maceração, para a extração e clarificação de alguns sucos de frutas e vegetais. Barros, Mendes e Peres (2004) conseguiram diminuir 22,3% e 30% a viscosidade de sucos de abacaxi e cereja, respectivamente, com a utilização de uma mistura de enzimas contendo pectinases, celulasas e hemicelulasas. No entanto, as preparações de pectinases comerciais usadas no processamento de

alimentos, são tradicionalmente, misturas de poligalacturonase, pectinesterase e pectina liase (LANG; DÖRNENBURG, 2000; SEMENOVA et al., 2006).

2.4 Microrganismos produtores de pectinases e influência das condições de cultivo sobre a síntese enzimática

A habilidade para sintetizar enzimas pectinolíticas é muito comum entre os grupos de microrganismos, mas os fungos são os preferidos em escala industrial, pois cerca de 90% das enzimas produzidas podem ser secretadas no meio de cultura (BLANDINO et al., 2001; UENOJO; PASTORE, 2007).

As preparações comerciais mais comumente utilizadas são de origem fúngica, principalmente de *Aspergillus niger*, visto que esta espécie recebe a classificação GRAS (generally recognized as safe) do FDA (Food and Drugs Administration), órgão responsável pelo controle de alimentos e medicamentos nos EUA (GUMMADI; PANDA, 2003; SCHUSTER et al., 2002). Essa espécie de fungo produz várias pectinases, incluindo pectinametilesterase (PME), poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL).

Além do gênero *Aspergillus* outros fungos filamentosos produtores de pectinases são citados pela literatura. Dentre eles pode se destacar o *Penicillium*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Monilia*, *Coniothyrium* e *Rhizopus*, além de vários outros que vêm sendo avaliados como potentes produtores de pectinases (PATIL; DAYANAND, 2006).

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. O estudo de outros microrganismos produtores de pectinases é fundamental para a obtenção de

enzimas com características distintas, adequadas a materiais e processos industriais específicos (GERVAIS; MOLIN, 2003).

Atualmente novos estudos estão sendo incentivados, buscando o isolamento de pectinases fúngicas e sua aplicação no setor comercial. O *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries foi considerado em estudos anteriores como um bom produtor de pectinases. Diversos fatores podem justificar esta afirmação, incluindo o fato deste microrganismo não necessitar de amplos espaços para seu crescimento; conseguir degradar e crescer em amplos substratos, inclusive em resíduos industriais; possuir um crescimento rápido quando as condições de crescimento são favoráveis; sintetizar enzimas em quantidades significativas quando comparado a outros microrganismos, além de não ser patogênico ao homem.

Pesquisas recentes revelam que ao selecionar fungos produtores de pectinases é essencial estudar a condição de cultivo ideal para o microrganismo, visando otimizar a produção enzimática no meio selecionado (BLANDINO et al., 2002; KASHYAP et al., 2000; MARTÍNEZ-TRUJILLO et al., 2011; PALANIYAPPAN et al., 2009; PATIL; DAYANAND, 2006; SUNNOTEL; NIGAM, 2002; TARAGANO; PILOSOF, 1999; YUGHANDAR et al., 2008).

Nesse contexto, dentre os fatores que afetam o crescimento microbiano e a biossíntese enzimática pode-se destacar a composição do meio de cultura, particularmente a fonte de carbono, presença de indutores (pectina e derivados) e outras condições de cultivo, como pH do meio nutriente, temperatura de fermentação, aeração, agitação e tempo de incubação (MALVESSI; SILVEIRA, 2004; MARTÍNEZ-TRUJILLO et al., 2009).

A produção de pectinases por microrganismos pode ser induzida tanto por processos de fermentação submersa (FS) quanto em estado semi-sólido (FES) (BARENSE et al., 2001; HOONDAL et al., 2002).

A fermentação em estado sólido (FES), ou fermentação semi-sólido (FSS), conforme definida por Holker e Lenz (2005) caracteriza-se pelo cultivo de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida úmida, que simulam as condições ambientais sob as quais os microrganismos se desenvolvem na natureza. Este processo envolve o crescimento de microrganismos em materiais sólidos nos quais não há líquido livre. Assim, a água torna-se um fator limitante do processo, o que não ocorre na fermentação líquida (submersa), onde há abundância da fase aquosa.

As fermentações submersas (FS) incluem uma variedade grande de processos microbianos onde a biomassa é completamente rodeada pelo meio de cultivo líquido. Neste tipo de fermentação os substratos sólidos encontram-se dissolvidos ou submersos em meio líquido (PALMA, 2003).

É tarefa difícil generalizar vantagens relacionadas aos processos submersos, ou em estado sólido, sabendo-se que cada microrganismo pode melhor se adequar a um ou outro processo, bem como produzir complexos enzimáticos diferentes (COURI et al., 2003; PAPAGIANNI, 2004).

O sistema de fermentação em condições submersas tem sido usado com sucesso na produção de pectinases fúngicas para fins de purificação (SUNNOTEL; NIGAM, 2002). A produção de enzimas em escala industrial se faz majoritariamente por fermentação submersa (COUTO; SANROMÁN, 2006).

Apesar da fermentação em estado sólido (FES) simular as condições ambientais sob as quais os microrganismos se desenvolvem na natureza e permitir a produção de enzimas brutas mais concentradas, a fermentação em estado sólido (FES) apresenta algumas desvantagens em relação a fermentação submersa (FS) como a heterogeneidade das condições de fermentação, dificultando a reprodução dos resultados em pesquisas biotecnológicas; sistemas

de cultivo heterogêneos, em termos de população microbiana e concentração de soluto; dificuldade em controlar alguns parâmetros de fermentação como pH, temperatura, agitação e concentração de nutrientes e produtos; tempo de cultivo superior, estendendo o período de obtenção das enzimas para fins industriais; técnicas dispendiosas de purificação dos metabólitos produzidos e dificuldade de remoção do calor gerado pelo metabolismo dos microrganismos (HOLKER; LENZ, 2005; PEDROLI et al., 2009).

A relação apresentada acima é uma generalização. Na verdade, cada processo específico tem de ser avaliado independentemente, de forma a permitir uma escolha correta da forma de condução. Pode-se afirmar que cada uma destas técnicas possui suas particularidades e potencialidades (PATIL; DAYANAND, 2006; TARAGANO; PILOSOF, 1999).

2.4.1 Influência do pH do meio de cultivo sobre a síntese de pectinases

Conforme discutido anteriormente, para estudar a produção de pectinases por novos microrganismos é necessário controlar alguns parâmetros que podem influenciar na síntese enzimática. O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, havendo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o desenvolvimento de cada microrganismo. Sabe-se que alterações no pH do meio de cultivo podem resultar em maior ou menor produção enzimática, isso porque o pH do meio afeta o metabolismo dos microrganismos (GARZÓN; HOURS, 1992).

Estudos tem sido realizados na tentativa de estabelecer as melhores condições de pH inicial do meio de cultivo, que resultem em máxima produção de pectinases. Geralmente fungos preferem pH baixo (4,5-5,0) e as bactérias pH próximos à neutralidade (6,5-7,0) (PERAZZO NETO, 1999).

Algumas pesquisas corroboram esses resultados. Malvessi e Silveira (2004) avaliaram a influencia do pH sobre a produção de pectinases, em processo submerso, por *Aspergillus oryzae* e observaram que as maiores atividades de endo-PG foram alcançadas com processo iniciado em pH 4. De acordo com a pesquisa de Patil e Dayanand (2006), o pH 5 foi ótimo para a máxima produção de exo e endo-poligalacturonase, em ambas as condições de cultivo, meio sólido e líquido. Palaniyappan et al. (2009) constataram em seu estudo que o pH ótimo para a produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger* (MTCC: 281) é 5,5 e valores de pH acima ou abaixo deste resultam em redução na atividade enzimática.

Acuña-Argüelles et al. (1995) estudaram a estabilidade da enzima poligalacturonase de *Aspergillus niger* CH4, em fermentação submersa com oscilação no pH e observaram que a enzima foi rapidamente desnaturadas em valores de pH acima de 5,0. Resultado semelhante foi observado por Martos et al. (2009), em sua pesquisa com fermentação submersa de *Aspergillus Níger*, onde a máxima produção de poligalacturonase ocorreu em pH próximo a 4,7, com um declínio na atividade enzimática em pH superior a este.

Martínez-Trujillo et al. (2011) estudaram a otimização das condições de cultivo das linhagens *Aspergillus flavipes* FP-500 e *Aspergillus terreus* FP-370. Em ambas as linhagens, o meio de cultivo com valores de pH ácido (cerca de 3,5) favoreceu a produção de exopectinase e endopectinase, enquanto maiores valores de pH (próximo a 5,0) aumentou a síntese de pectina liase.

2.4.2 Influência do tempo de cultivo sobre a síntese de pectinases

Assim como o pH pode influenciar no crescimento microbiano, o tempo de cultivo influencia o nível de produção das enzimas pectinolíticas, pois a

produção enzimática está diretamente associada ao estado fisiológico em que o fungo se encontra e a quantidade de microrganismos presentes (BRUMANO et al., 1993; THILAKAVATHI; BASAK; PANDA, 2007).

Em geral, observa-se um tempo ótimo de cultivo específico para cada microrganismo, no qual tem-se uma maior produção de pectinases. Após este intervalo de tempo, nota-se uma estabilização e/ou diminuição na atividade pectinolítica. Este declínio na atividade enzimática pode estar relacionado ao consumo de algum composto essencial, aparecimento de um metabólito inibidor ou à própria desnaturação das enzimas já sintetizadas (BARNBY; MORPETH; PYLE, 1990).

Segundo Camargo et al. (2005), outra justificativa para a redução dos níveis de pectinases com o tempo de cultivo é o aparecimento de diversos açúcares redutores resultantes da hidrólise da pectina por ação das enzimas pectinolíticas. A repressão catabólica da síntese de enzimas pectinolíticas pela glicose, frutose e intermediários da via glicolítica tem sido observada em muitos microrganismos (FAWOLE; ODUNFA, 2003; RUNCO; NAVARRO; MALDONADO, 2001). Estas informações podem justificar os resultados de alguns estudos nos quais a atividade enzimática foi crescente até um intervalo de tempo específico.

A pesquisa de Viswanathan e Jagadeeshbabu (2008) validam estas informações, pois a atividade de poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* em condições submersas, teve um aumento gradual no intervalo de tempo entre 24-72 horas e após este período ocorreu um declínio nos níveis de atividade enzimática.

Martos et al. (2009), em seu estudo sobre otimização das condições de cultivo de *Aspergillus niger* em fermentação submersa, observou um efeito positivo do tempo de cultivo sobre a produção de poligalacturonase e

pectinametilesterase. No entanto, o efeito quadrático desta variável foi negativo, o que indicou um aumento na produção de poligalacturonase, até 94 horas, e pectinametilesterase, até 74 horas, após estes intervalos de tempo ocorreu um declínio na atividade enzimática.

Palaniyappan et al. (2009) avaliaram o efeito das condições de cultivo em meio submerso sobre a produção de pectinases por *Aspergillus niger* (MTCC: 281) e constatou que o tempo ideal de fermentação foi 72 h de cultivo. Após este intervalo ocorreu uma redução expressiva na atividade enzimática, a qual pode ter sido ocasionada pelo esgotamento de nutrientes no meio de cultivo.

Pode-se observar que o tempo de cultivo para a máxima produção de pectinases é variável entre os grupos de microrganismos e as condições de cultivo. Segundo Ustok, Tari e Gogus (2007), a comparação direta dos valores de atividade enzimática não é prudente, pois nem todas as condições são idênticas, podendo ser usada como uma avaliação grosseira da produção de enzimas. O estudo de Silva et al. (2005) confirmam a afirmação anterior, onde o tempo ótimo de cultivo para a síntese de pectinases (PL, exo-PG e endo-PG) pelo fungo *Penicillium viridicatum* RFC3 variou quando comparado apenas os frascos de cultivo (erlenmeyer e polipropileno).

2.4.3 Influência da composição do meio de cultivo sobre a síntese de pectinases

Em geral, as pectinases são enzimas induzidas o que torna necessário a suplementação do meio de cultura com pectina ou matérias ricas em pectina, tais como bagaço de cana-de-açúcar, maçã ou cascas de frutos cítricos. Diferentes fontes de carbono podem influenciar no crescimento de microrganismos, como também na sua produção enzimática (MALVESSI; SILVEIRA, 2004). O efeito

de diferentes fontes de carbono na síntese de pectinases por fungos 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 (FAVELA-TORRES; VOLKE-SEPULVEDA; VINIEGRA-GONZALEZ, 2006).

Viswanathan e Jagadeeshbabu (2008) estudaram o efeito indutor da pectina em seis espécies de *Aspergillus* e concluíram que a atividade enzimática aumenta de forma significativa com a adição de pectina ao meio de cultivo (20g/L). Esses resultados corroboram com a pesquisa de Martos et al. (2009) na qual a condição ótima para a produção da enzima poligalacturonase e pectinametilsterase por *Aspergillus niger* foi em meio de cultivo suplementado com pectina, na concentração de aproximadamente 20g/L. Baixas concentrações de pectina no meio de cultivo resultam em menor rendimento na produção de pectinases, já que são enzimas induzidas pelo substrato pectina (MALVESSI; SILVEIRA, 2004).

Palaniyappan et al. (2009), em seu estudo de otimização das condições de cultivo para a produção de pectinases por *Aspergillus niger* (MTCC: 281), observou que um aumento na concentração do substrato indutor além de 1% (w/v), resulta em um decréscimo na atividade enzimática, o que pode ser causado devido à produção de outros metabólitos durante a fermentação e também por causa do aumento da viscosidade do meio de cultura, o que pode dificultar a difusão de nutrientes, oxigênio e dióxido de carbono e conseqüentemente a disponibilidade de nutrientes (TARAGANO; PILOSOFF, 1999).

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 pécnicos. 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 (BISCARO et al., 2009).

2.5 Extração e purificação de pectinases

A purificação e caracterização de enzimas constituem linhas de pesquisa importantes, pois permitem a distinção entre os diferentes componentes do complexo enzimático, além de aumentar sua estabilidade, atividade e especificidade. A otimização de um protocolo de purificação envolve muita experimentação do tipo tentativa e erro, pois mesmo quando se conhecem as características físico-químicas da proteína a ser purificada, o seu comportamento durante a purificação é imprevisível. O grande desafio deste processo é o trabalho para se encontrar as melhores estratégias e, se for o caso, adequar a metodologia para a escala de produção pretendida, garantindo que o produto final tenha todas as características necessárias para a sua aplicação (ALMEIDA; KURTENBACH, 2002; SANTOS, 2001).

Nos processos de purificação enzimática, várias metodologias estão sendo aplicadas e 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 etapa deve ser efetuado. A escolha das técnicas a serem usadas está vinculada às propriedades moleculares inerentes a cada enzima; sendo assim, a combinação correta de etapas que exploram estas propriedades permitirá a purificação a partir de uma mistura (LIMA et al., 2001).

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 processos tais como filtração, centrifugação, precipitação parcial, ultrafiltração, diálise e cromatografia são usualmente aplicados em processos de purificação enzimática (BRACHT; ISHII-IWAMOTO, 2003).

Após o processo fermentativo, iniciam-se as operações de extração e separação enzimática. A primeira etapa da purificação é a separação das células microbianas e obtenção de um extrato (extrato bruto) contendo a enzima. No caso das enzimas microbianas, a separação inicial do extrato bruto pode ser facilmente obtida já que as enzimas são liberadas para o meio de cultura. Na maioria das vezes, são utilizadas técnicas de filtração e centrifugação para clarificar o extrato enzimático bruto (HO et al., 2000; PESSOA; KILIKILIAN, 2005). O prosseguimento ao processo deve ser feito após um planejamento da estratégia a ser utilizada, na qual, além da estabilidade da proteína, deve-se também considerar os seguintes itens: eficiência do processo, viabilidade econômica e tipo de aplicação final do produto (HO et al., 2000).

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. Em uma série de etapas independentes, as diferentes propriedades físico-químicas da proteína de interesse são utilizadas para separá-la progressivamente de outras substâncias. 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 precipitação é uma das operações mais adotadas para a purificação de proteínas tanto de origem microbiana como animal ou vegetal. É uma das principais técnicas utilizadas para a separação de proteínas de uma mistura em virtude da sua simplicidade e tem sido empregada há décadas. Tradicionalmente é considerada como um método de concentração e utilizada antes da aplicação de métodos de maior resolução na purificação (LUCCARINI; KILIKIAN; PESSOA JÚNIOR, 2005). 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. 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).

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, um efeito denominado precipitação por salificação (*salting-out*), sendo 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 à 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 são: 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%. Com uma porcentagem 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).

Após as etapas de purificação enzimática é necessário obter uma fração concentrada e homogênea da enzima de interesse após a seqüência 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 diálise, ultrafiltração e liofilização nas etapas finais (MARTINS, 2006).

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).

2.6 Influência do pH e temperatura sobre a estabilidade de pectinases

Para a produção industrial e conseqüente comercialização de pectinases é fundamental a caracterização da estabilidade enzimática, visando estabelecer as condições de pH e temperatura em que a enzima poderá ser aplicada. A estabilidade de pectinases é afetada por parâmetros físicos (pH e temperatura) e parâmetros químicos (inibidores ou ativadores). Muitos pesquisadores têm destacado em seus estudos as condições ideais de temperatura e pH para cada enzima, visando evitar a inativação ou perda de estabilidade enzimática.

A grande maioria dos relatos encontrados na literatura mostram que a estabilidade das enzimas frente ao pH e temperatura é estudada através do método considerado como tradicional, ou seja, a estabilidade térmica é estudada em condições de pH constante e vice-versa. Tem sido relatado que a maioria das

pectinases fúngicas apresentam estabilidade em condições ácidas de pH (GUMANDI; KUMAR, 2006) e foram suscetíveis a desnaturação a temperaturas acima de 50 ° C (GALIOTOU-PANAYOTOU; KAPANTAI; KALANTZI, 1997). Além disso, a maioria têm a faixa de pH ótimo de 3,5-5,5 e faixa de temperatura ideal de 30-50 ° C (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Nesse contexto, Kaur, Kumar e Satynarayana (2004) estudaram a estabilidade de poligalacturonase produzida por *Sporotrichum thermophile* APINIS e verificaram que a enzima é completamente ativa em uma larga faixa de pH (3,0 a 9,0) e temperatura (30 a 80°C), com valores ótimos de 7,0 e 55°C, respectivamente.

Na avaliação da influência do pH e da temperatura sobre a ação de endo e exo-PG produzida por *Aspergillus oryzae* em processo submerso, as maiores atividades de endo-PG foram obtidas em pH em torno de 4,7 e temperatura entre 35-40°C, ao passo que para exo-PG a temperatura ótima de atividade variou numa faixa entre 55 e 60°C e pH 4,5 (MALVESSI; SILVEIRA, 2004).

O efeito de interação entre pH e temperatura é outro aspecto interessante, que altera a estabilidade de forma diferente. O efeito combinado de pH e temperatura na estabilidade de três pectinases, PMG, PG e PL de *Aspergillus niger* foi estudado por Naidu e Panda (1998), utilizando metodologia de superfície de resposta. O pH e temperatura ótimos foram 2,23 e 23,8°C, respectivamente, para PMG, 4,8 e 28,8°C, respectivamente, para PG e 3,9 e 29,8°C, respectivamente, para PL.

Teng-Guo et al. (2002) relataram que a PG de *Aspergillus niger* foi estável a 35 ° C, e sua incubação a 40 ° C e 50 ° C por 30 minutos resultou em perdas de atividades de 45 e 74%, respectivamente. Além disso, eles relataram que a PG foi quase inativada a uma temperatura acima de 60 ° C durante 5 min.

A endo-PG obtida de *Aspergillus japonicus* perdeu mais de 50% da sua atividade quando mantida a 50 ° C durante 5 minutos (SEMENOVA et al., 2003).

A enzima PG de *Aspergillus giganteus* manteve 80 % de sua atividade original após 50 min de incubação a 55 ° C. O aquecimento desta enzima a 55 °C por 10 min resultou em desnaturação rápida e apenas cerca de 9,5% da sua atividade foi retida (PERDOLLI et al., 2008).

Silva et al. (2002) relataram que a PG de *Penicillium viridicatum* RFC3 perdeu 90% da sua atividade original após 1 h de incubação a 55 ° C. Por outro lado, Martins et al. (2002) mostraram que a PG de *Thermoascus aurantiacus* 179-5 manteve 100% da atividade original durante 2 horas a 60 ° C. Enquanto que, a PG de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 foi 100% estável a 50 ° C por 1 h (MARTINS et al., 2007).

Perdolini et al. (2008) relatam que a PG de *Aspergillus giganteus*, reteve mais de 90% de sua atividade, após 24 h de incubação em valores de pH entre 4,5 e 8,0. Um resultado similar foi obtido com a PG de *Penicillium viridicatum*, que manteve 90% da sua atividade, após incubação em pHs 5,0-8,5 (SILVA et al., 2002). Martins et al. (2007) relataram que a PG de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 foi estável a pH 5,0-5,5 e manteve 33% da atividade inicial em pH 9,0 após 24 h de incubação.

REFERÊNCIAS

ACUNA-ARGUELLES, M. E. et al. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in sub-merged and solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 43, n. 5, p. 808-814, Sept. 1995.

AHLAWAT, S. et al. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. **Process Biochemistry**, London, v. 44, n. 5, p. 521-526, May 2009.

ALKORTA, I. et al. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 33, n. 1, p. 21-28, Jan. 1998.

ALMEIDA, C. et al. Continuous production of pectinase by immobilized yeast cells on spent grains. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 5, p. 1937-1942, Sept. 2005.

ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E. Como purificar proteínas? **Biociência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 24, n. 1, p. 30-35, 2002.

BARENSE, R. I. et al. Partial purification and characterization of exopolygalacturonase II and III of *Penicillium frequentans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 327-330, Oct./Dec. 2001.

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

BARROS, S. T. D.; MENDES, E.; PERES, L. Influence of despectinization in the ultrafiltration of west indian cherry (*Malpighia glabra* L.) and pineapple (*Ananas comosus* (L. Meer) juices). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 194-200, abr./jun. 2004.

BISCARO, P. D. et al. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, London, v. 3, n. 1, p. 9-18, Feb. 2009.

BLANDINO, A. T. et al. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 58, n. 1, p. 164-169, Feb. 2002.

_____. Utilisation of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Process Biochemistry**, London, v. 37, n. 5, p. 497-503, May 2001.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. **Métodos de laboratório em bioquímica**. Barueri: Manole, 2003. 550 p.

BRUMANO, M. H. N. et al. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions. **Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 225-228, 1993.

CAMARGO, L. A. et al. Utilização de bagaço de laranja na produção de pectinases de *Aspergillus* SP. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 2, p. 153-156, abr./jun. 2005.

CARDOSO, P. G. et al. Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 71-77, 2007.

CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L. Produção de poligalacturonases pelo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2 e algumas propriedades da enzima. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 135-141, jan./mar. 2009.

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

COURI, S. et al. Influence of metal ions on pellet morphology and polygalacturonase synthesis by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 16-21, 2003.

COUTO, S. R.; SANROMAN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry: a review. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 76, n. 3, p. 291-302, Oct. 2006.

- DINU, D. Extraction and characterization of pectins from wheat bran. **Roumanian Biotechnology Letters**, Bucarest, v. 6, n. 1, p. 37-43, 2001.
- FAVELA-TORRES, E.; VOLKE-SEPULVEDA, T.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 2, p. 221-227, 2006.
- FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Birmingham, v. 52, n. 2, p. 223-227, Apr. 2003.
- GAINVORS, A. et al. Detection of polygalacturonase, pectin lyase and pectinesterase activities in *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast**, Davis, v. 10, n. 10, p. 1311-1319, Oct. 1994.
- GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KAPANTAI, M.; KALANTZI, O. Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 47, n. 4, p. 425-429, 1997.
- GARZÓN, C. G.; HOURS, R. A. Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. **Bioresource Technology**, Essex, v. 39, n. 1, p. 93-95, Mar. 1992.
- GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, n. 1, p. 85-101, Jan. 2003.
- GUMANDI, S. N.; KUMAR, D. S. Enhanced production of pectin lyase and pectate lyase by *Debaryomyces nepalensis* in submerged fermentation by statistical methods. **American Journal of Food Technology**, New York, v. 1, n. 1, p. 19-33, 2006.
- 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.
- HADJ-TAIEB, N. et al. Fermentor production of pectinases on gruel, a local byproduct and their use in olive oil extraction. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 5, p. 1072-1076, Sept. 2006.

HEERD, D. et al. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. in solid-state fermentation: a comparative study. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 90, n. 2, p. 102-110, Apr. 2012.

HENNIES, P. T. **Produção de pectinases de *Penicilium italicum* através de fermentação em meio semi-sólido**. 1996. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

HO, P. L. et al. A arte de purificar proteínas: uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico. **Biotecnologia**, Brasília, v. 13, n. 1, p. 24-26, 2000.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation: are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 301-306, June 2005.

HOONDAL, G. S. et al. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 59, n. 4/5, p. 409-418, 2002.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, Sept. 2005.

KAPOOR, M. et al. Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibers. **Process Biochemistry**, London, v. 36, n. 8/9, p. 803-807, Mar. 2001.

KARAM, N. E.; BELARBI, A. Detection of polygalacturonase and pectinesterases in lactic acid bacteria. **World Journal Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 559-563, 1995.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 215-227, May 2001.

_____. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp DT7. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 277-282, 2000.

KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYNARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Aipinis. **Bioresource Technology**, Essex, v. 94, n. 3, p. 239-243, Sept. 2004.

KULA, M. R. Enzymes. In: BRAUER, H. (Ed.). **Fundamentals of biotechnology**. Weinheim: VCH, 1987. v. 2, p. 725-760.

LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, n. 4, p. 366-375, Aug. 2000.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: E. Blucher, 2001. v. 3, 593 p.

LUCCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V.; PESSOA JÚNIOR, A. Precipitação. In: PESSOA JÚNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. (Coord.). **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. v. 1, p. 89-113.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. da. 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. 2004.

MARTINEZ-TRUJILLO, A. et al. Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* FP-500 and their modulation by pH and carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 40-47, 2009.

_____. Use of fruit residues for pectinase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 and *Aspergillus terreus* FP-370. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 202-209, Aug. 2011.

MARTINS, E. **Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido**. 2006. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MARTINS, E. S. **Purificação de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido e caracterização bioquímica das mesmas**. 2006. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

_____. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 91, n. 3, p. 291-299, 2007.

_____. Solid-state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, London, v. 37, n. 9, p. 949-954, Apr. 2002.

MARTOS, M. A. et al. Production of pectinases by *A. niger*: influence of fermentation conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 3, p. 567-572, May/June 2009.

MAYANS, O. et al. Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. **Structure**, Philadelphia, v. 15, n. 5, p. 677-689, May 1997.

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

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Application of response surface methodology to evaluate some aspects on stability of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemistry Engineering Journal**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 71-77, Jan. 1998.

NIGHOJKAR, S. et al. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. **Process Biochemistry**, London, v. 41, n. 6, p. 1136-1140, June 2006.

NITURE, S. K. Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. **Biologia**, Lahore, v. 63, n. 1, p. 1-19, 2008.

PALANIYAPPAN, V. M. et al. Screening of natural substrates and optimization of operating variables on the production of pectinase by submerged fermentation using *Aspergillus niger* MTCC 281. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 8, n. 4, p. 682-686, Aug. 2009.

PALMA, M. B. **Produção de Xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido**. 2003. 169 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, New York, v. 22, n. 2, p. 189-259, Feb. 2004.

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**, Essex, v. 97, n. 18, p. 2340-2344, Dec. 2006.

PEDROLI, D. B. et al. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, London, v. 3, n. 1, p. 9-18, Feb. 2009.

PERAZZO NETO, A. **Determinação de parâmetros para o enriquecimento protéico da algaroba (*Prosopis juliflora*) com *Aspergillus niger***. 1999. 130 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

PERDOLLI, D. B. et al. Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 144, n. 2, p. 191-200, Feb. 2008.

PERICIN, D. M. Production of exo-pectinase by *Penicillium roqueortii* using pumpkin oil cake. **Natural Science**, Irvine, n. 113, p. 313-320, 2007.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. 456 p.

PHUTELA, U. et al. 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, 2005.

RAI, P.; MAJUMDAR, G. C.; GUPTA, S. D. Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 64, n. 3, p. 397-403, Sept. 2004.

RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 929-967, July 2001.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectic enzymes. In: ROSE A. H. (Ed.). **Microbial enzymes and bioconversions**. London: Academic, 1980. p. 227-272.

RUNCO, R.; NAVARRO, A. R.; MALDONADO, M. C. Regulation of the production of polygalacturonase by *Aspergillus terreus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 487-491, 2001.

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

SANTOS, E. S. **Recuperação e purificação de enzimas usando adsorção em leite expandido**. 2001. 152 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

SANTOS, S. F. M. et al. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 1973-1978, 2008.

SCHELLER, H. V. et al. Biosynthesis of pectin. **Physiology Plant**, Minneapolis, v. 129, n. 2, p. 283-295, June 2007.

SCHOLS, H. A. et al. A xylogalacturonan subunit present in the modified hairy regions of apple pectin. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 279, p. 265-279, 1995.

SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 59, n. 4/5, p. 426-435, Aug. 2002.

SEMENOVA, M. V. et al. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. **Biochemistry**, New York, v. 68, n. 5, p. 559-569, Sept. 2003.

_____. Use of a preparation from fungal pectin lyase in the food industry. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Berlin, v. 42, n. 6, p. 598-602, Nov./Dec. 2006.

SHEN, Z. G. et al. Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): purification and characterization. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 209-214, Aug. 1999.

SILVA, D. et al. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 318-324, Oct./Dec. 2002.

_____. Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 8, p. 2885-2889, July 2005.

SUNNOTEL, O.; NIGAM, P. Pectinolytic activity of bacteria isolated from soil and two fungal strains during submerged fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 835-839, Dec. 2002.

TARAGANO, V. M.; PILOSOF, A. M. R. Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 25, n. 3/5, p. 411-419, Aug. 1999.

TENG-GUO, C. et al. Purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Aspergillus niger*. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 26, n. 3, p. 253-265, Mar. 2002.

THILAKAVATHI, M.; BASAK, T.; PANDA, T. Modeling of enzyme production kinetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 73, n. 5, p. 991-1007, Jan. 2007.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 388-394, mar./abr. 2007.

USTOK, F. I.; TARI, C.; GOGUS, N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 127, n. 2, p. 322-334, Feb. 2007.

VIKARI, L.; TENAKANEN, M.; SUURNAKKI, A. Biotechnology in the pulp and paper industry. In: REHM, H. J. (Ed.). **Biotechnology**. Washington: VCH-Wiley, 2001. p. 523-546.

VINCKEN, J. P. et al. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan: I., implications for cell wall architecture. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 132, n. 4, p. 1781-1789, Aug. 2003.

VISSER, J.; VORAGEN, A. G. J. Pectins and pectinases. **Progress in Biotechnology**, Amsterdam, v. 14, n. 1, p. 79-88, 1996.

VISWANATHAN, R.; JAGADEESHBABU, P. E. Studies on the production of pectinase from tamarind kernel powder by submerged fermentation using *Aspergillus* species and optimization of medium using design expert. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Lausanne, v. 22, n. 4, p. 481-489, Aug. 2008.

VRIES, R. P. et al. Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 530, n. 1, p. 41-47, 2002.

_____. Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 327, n. 4, p. 401-410, Aug. 2000.

VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, London, v. 65, n. 4, p. 497-522, Apr. 2001.

WHITAKER, J. R. Microbial pectolytic enzymes. In: FOGARTY, W. M.; KELLY, C. T. (Ed.). **Microbial enzymes and biotechnology**. New York: Elsevier Science, 1990. p. 133-176.

_____. **Pectic enzymes: principles of enzymology for the food sciences**. 2nd ed. New York: Elsevier, 1994. p. 425-436.

WILLATS, W. G. T. et al. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 47, n. 1, p. 9-27, Jan. 2001.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n. 1, p. 97-104, Mar. 2006.

YADAV, S. et al. Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. **Process Biochemistry**, London, v. 43, n. 5, p. 547-552, May 2008.

YUGHANDAR, N. M. et al. Optimization of pectinase production from *Manihot utilissima* by *Aspergillus niger* NCIM 548 using statistical experimental design. **Research Journal of Microbiology**, New York, v. 3, n. 1, p. 9-16, Mar. 2008.

ZHANG, J.; HENRIKSSON, G.; JOHANSSON, G. Polygalacturonase is the key component in the enzymatic retting of flax. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 85-89, Jan. 2001.

CAPÍTULO 2: Produção de Pectinases por *Cladosporium cladosporioides*

(Fres.) de Vries: Influencia das condições de fermentação

RESUMO

O estudo objetivou otimizar as condições de cultivo do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. O fungo foi cultivado em condições submersas para avaliar os efeitos do tempo de incubação, pH inicial e concentração de pectina sobre a produção de pectina liase (PL), pectinametilesterase (PME), exo-poligalacturonase (exo-PG) e endo-poligalacturonase (endo-PG). A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para otimizar a síntese das enzimas em estudo. Os parâmetros estudados foram tempo de fermentação (24 a 120 horas), pH (3,5 a 6,5) e concentração inicial de pectina (5 a 20 g / l). A produção máxima de PL (7000 U/mg), exo-PG (1 U/mg) e endo-PG (40U/mg) foi obtida em pH inferior a 3,5, concentrações de pectina superior a 16g/L e tempo de cultivo menor que 40 horas. Em contrapartida, a condição ótima de cultivo para a enzima PME (300U/mg) foi obtida em pH maior que 6,5, pectina próximo a 20g/L e tempo entre 120 a 140 horas. Diante destes resultados, o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries apresenta potencial para ser utilizado como produtor de pectinases para a indústria alimentícia, pois existe um valor de pH (3,5), tempo (inferior a 40 horas) e pectina (superior a 16g/L), onde a produção das enzimas PL, Exo e Endo-PG é alta e a produção de PME é mínima. Esta situação é almejada pela indústria alimentícia para reduzir a produção de metanol durante o processamento de alimentos.

Palavras-chave: Pectinametilesterase. Pectina liase. Exo-poligalacturonase. Endo-poligalacturonase. Condições de cultivo.

ABSTRACT

The study aimed to optimize the growing conditions of the fungus *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries. The fungus was cultivated under submerge conditions to mitigate the effects of incubation time, initial pH and concentration of pectin upon the production of pectin lyase (PL), pectinmethylesterase (PME), exo-polygalacturonase (exo-PG) and endo-polygalacturonase (endo-PG). The surface response methodology was used to optimize the synthesis of the enzymes under study. The investigated parameters were fermentation time (24 to 120 hours), pH (3.5 to 6.5) and initial concentration of pectin (5 to 20 g / l). The maximum production of PL (7000 U/mg), exo-PG (1 U/mg) and endo-PG (40U/mg) was reached at pH lower than 3.5, concentrations of pectin superior to 16g/L and cultivation time shorter than 40 hours. On the other hand, the optimum cultivation condition for the enzyme PME (300U/mg) was obtained at pH higher than 6.5, pectin close to 20g/L and time between 120 to 140 hours. Before those results, the fungus *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries presents potential to be utilized as a producer of pectinases for the food industry, for there is a pH value (3.5), time (shorter than 40 hours) and pectin (superior to 16g/L), where the production of the enzymes PL, Exo and Endo-PG is high and the pME production is minimal. This situation is longed for by the food industry to reduce the methanol production during food processing.

Keywords: Pectinmetilesterase. Pectin lyase. Exo-polygalacturonase. Endo-polygalacturonase. Culture conditions.

1 INTRODUÇÃO

As pectinases são um grupo de enzimas que decompõem a pectina de forma sequencial e sinérgica, através de reações de desesterificação e despolimerização. Para a completa degradação da molécula de pectina é necessário a ação de um complexo enzimático composto de poligalacturonases (PG; EC 3.2.1.15), pectinametilesterase (PE; EC 3.1.1.11) e pectina liase (PL; EC 4.2.2.10) (PEDROLI et al., 2009; ROMBOUTS; PILNIK, 1980; SAKAI et al., 1993).

As pectinases são amplamente utilizadas em diversos setores industriais, principalmente no processamento de frutas e vegetais, porque reduzem a viscosidade de sucos e facilitam o processo de extração, maceração, liquefação, estabilização e clarificação (MARTOS et al., 2009). As pectinases também são empregadas no tratamento de águas residuais pécnicas, extração de petróleo, fabricação de papel, processamento de bebidas alcoólicas, entre outras (KASHYAP et al., 2001; PHUTELA et al., 2005).

Em função dessa vasta gama de aplicações, os estudos que envolvem a produção de novas pectinases fúngicas estão sendo incentivados. Atualmente o alto custo na produção enzimática 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.

A escolha do substrato para a produção de pectinase microbiana é um processo complexo e depende de vários fatores. Estudos mostram que a síntese de enzimas pectinolíticas por microorganismos é altamente influenciada pelos componentes do meio de cultivo e que enzimas extracelulares são sintetizadas em maiores quantidades quando os substratos indutores estão presentes nos

meios de cultivo (COSTA et al., 2007; PALANIYAPPAN et al., 2009). Nesse contexto, ao estudar um microrganismo produtor de enzimas, é importante conhecer as condições operacionais ideais para obter produtividade enzimática elevada (FAVELA-TORRES; VOLKE-SEPÚLVEDA; VINIEGRA-GONZÁLEZ, 2006).

A maioria dos estudos que abordam as variáveis que interferem nas condições de cultivo avalia um fator de cada vez, mantendo os demais em nível constante. Esta abordagem não retrata os possíveis efeitos das interações entre as variáveis sobre a síntese enzimática (MARTOS et al., 2009; TARAGANO; PILOSOFF, 1999). Pesquisas recentes mostram algumas estratégias que podem ser consideradas para superar este problema. Entre elas estão os planejamentos experimentais, que tem sido usados com sucesso para otimizar as condições de cultivo e maximizar a resposta enzimática (GUMANDI; KUMAR, 2006; MARTÍNEZ-TRUJILLO et al., 2011; MARTOS et al., 2009; PALANIYAPPAN et al., 2009; TARAGANO; PILOSOFF, 1999; YUGHANDAR et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi otimizar e avaliar a produção de pectinases por *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries em fermentação submersa, utilizando planejamento experimental com superfície de resposta como ferramenta para determinar os efeitos do tempo de incubação, pH inicial e concentração de pectina sobre a produção de pectinametilesterase (PME), pectina liase (PL), exo-poligalacturonase (exo-PG) e endopoligalacturonase (endo-PG).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação do experimento

O experimento foi conduzido no setor de Microbiologia da Empresa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG/UFLA) e Laboratório de Enzimas do Setor de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (DBI/UFLA).

2.2 Microrganismo utilizado e condições de cultivo

O microrganismo avaliado quanto a produção de pectinases foi *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, isolado de grãos de café, pertencente a coleção de microrganismos da EPAMIG/UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil. As culturas puras foram mantidas em ágar nutriente a 4°C. Para inocular o microrganismo nos meios de cultura foi preparada suspensão de esporos, utilizando água esterilizada como diluente, na concentração de $1,03 \times 10^7$ esporos/ml. Em seguida, 2 ml dessa suspensão de esporos foram inoculados em 50 ml do meio de cultura frio previamente esterilizado, reservado em frascos Erlenmeyers de 125 ml. Os frascos foram incubados em incubadora orbital, onde a fermentação submersa foi conduzida a 28 °C sob agitação constante (175 rpm).

O meio de cultura utilizado foi composto de (em g/100 mL) NaNO₃ (2,0), KH₂PO₄ (0,5), K₂HPO₄ (0,5), (NH₄)₂SO₄ (0,5), KCl (0,05), MgSO₄.7H₂O (0,1), FeSO₄(0,0005), ZnSO₄(0,007), peptona (0,1), extrato de levedura (0,2), além de solução de vitaminas (1,0 mL/100 mL). A solução de vitaminas foi composta de ácido nicotínico (100 mg), ácido p-aminobenzoico (10 mg), biotina (0,2 mg), piridoxina (50 mg), riboflavina (100 mg) e tiamina (50 mg). As vitaminas,

nessas proporções, foram solubilizadas em 100 mL de água destilada previamente esterilizada e só foram adicionadas ao meio de cultivo após a sua esterilização. O meio de cultivo foi suplementado com pectina em diferentes níveis, conforme será citado no planejamento experimental. Os Erlenmeyers contendo o meio de fermentação foram autoclavados a 120 °C, a 1 atm, por 15 minutos para posterior inoculação da solução de esporos.

2.3 Delineamento experimental

Foi usado o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) como ferramenta para otimizar as condições de cultivo. Os resultados foram analisados através de superfície de resposta. Foram estudadas três variáveis em cinco níveis. As variáveis independentes avaliadas foram: tempo de fermentação (X1), pH inicial (X2) e concentração inicial de pectina (X3). Como variável resposta ou dependente foram determinadas as atividades de pectinametilesterase (PME), pectina liase (PL), exo-poligalacturonase (exo-PG) e endopoligalacturonase (endo-PG).

Os Erlenmeyers foram incubados sob diferentes condições, em diferentes tempos de fermentação, conforme os ensaios do planejamento experimental. A Tabela 1 mostra as variáveis reais e codificadas, bem como os seus respectivos níveis.

Tabela 1 Variáveis experimentais com valores reais e codificados.

Variáveis		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Tempo (h)	X1	24	43,46	72	100,54	120,0
pH	X2	3,5	4,108	5,0	5,892	6,5
Pectina (g/L)	X3	5,0	8,04	12,5	16,956	20,0

O planejamento experimental consistiu de 20 ensaios (Tabela 2), sendo seis repetições no ponto central e cada ensaio conduzido em triplicata. A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa computacional Statistica versão 5.0 (STATISTICA, 1995).

Para complementar o estudo sobre as relações existentes entre as condições de cultivo do *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries e a síntese de PL, PME, Exo-PG e Endo-PG, também foi realizada análise exploratória por PCA dos dados obtidos a partir do planejamento fatorial. A matriz de dados foi construída usando as variáveis concentração de pectina, tempo de cultivo, pH e as atividades de PL, PME, Exo-PG e Endo-PG. Os dados passaram por pré-processamento usando autoescalamento. Os cálculos foram executados usando o programa Matlab versão 7.5.

2.4 Obtenção do extrato enzimático bruto e determinação das atividades enzimáticas

Os Erlenmeyers, contendo os meios de cultivo, foram recolhidos com o término do tempo de fermentação, conforme descrito nos ensaios do planejamento experimental.

Para a obtenção do extrato enzimático bruto, o meio foi filtrado em papel filtro (Whatman nº1). O filtrado obtido foi centrifugado a 7840 g durante 10 minutos a 5°C, e os sobrenadantes foram usados como fonte de enzimas. Esse sobrenadante, chamado de extrato enzimático bruto, foi estocado a 4°C, e no dia seguinte foi determinado o teor de proteínas totais e atividade enzimática específica de Pectinametilesterase (PME), Pectina Liase (PL), Exo-poligalacturonase (Exo-PG) e Endo-poligalacturonase (Endo-PG), conforme descrito a seguir. As determinações foram feitas em triplicata, e os resultados apresentados foram as médias obtidas.

2.4.1 Pectinametilesterase (PME)

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Schwan e Rose (1994). Uma solução de pectina cítrica a 1% (m/v) foi preparada em NaCl 0,1M, ajustando-se o pH da solução para 7,5 com NaOH 0,5M. Uma alíquota de 3 mL da solução de enzimas e 20 mL da solução de pectina cítrica foram adicionados em Erlenmeyer de 50 mL, sendo a mistura incubada durante 30 minutos, mantendo o pH em 7,5 pela adição de NaOH 0,02M. A atividade de PME foi estimada proporcionalmente ao volume de NaOH gasto na titulação e expressa em microequivalentes de ácido pécico liberado por mL⁻¹ h⁻¹. Uma unidade de pectinametilesterase (U) foi definida como a quantidade de enzima que liberou um microequivalente de ácido pécico por hora de reação.

2.4.2 Pectina liase (PL)

A atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Kashyap et al. (2000). Uma alíquota de 1 ml da solução enzimática

foi adicionada a 5mL da solução de pectina (1% m/v). O volume foi ajustado para 10 mL com água destilada. As amostras foram incubadas a 40°C por 2h e em seguida foi adicionado 0,6mL de sulfato de zinco 9% e 0,6 mL de hidróxido de sódio 0,5 M. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm/10 min) e 5 mL do sobrenadante foi adicionado a uma mistura de ácido tiobarbitúrico (3 mL, 0,04 M), HCl (2,5 mL, 0,1 M) e água destilada (0,5 mL). A mistura foi aquecida em banho-maria em ebulição por 30 minutos, resfriada à temperatura ambiente e a absorbância da solução foi lida a 550 nm. Uma unidade de atividade (U) foi dada como a quantidade de enzima que provocou uma alteração na absorbância de 0,01 na condição do ensaio.

2.4.3 Exo-poligalacturonase (Exo-PG)

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Schwan e Rose (1994). Uma curva de calibração para o ácido poligalacturônico foi construída utilizando o método de Miller (1959). Em um tubo de ensaio foi adicionado 1,5 mL da solução de enzimas e 1,0 mL de solução de sal sódico de ácido poligalacturônico a 0,1% em tampão citrato 0,1M pH 5,0. A mistura foi incubada em banho-maria a 40°C por 1 hora e após esse período a reação foi paralisada adicionando-se 1,5 mL de solução de ácido 3,5- dinitrossalicílico (DNS), sendo os tubos mantidos em banho fervente por 5 minutos e, em seguida, resfriados em banho de gelo. A absorbância da solução foi lida a 575nm.

A atividade (U) de Exo-PG foi expressa na forma de μmol de equivalentes de ácido galacturônico liberados por mL por minuto nas condições do ensaio.

2.4.4 Endo-poligalacturonase (Endo-PG)

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Barnby, Morpeth e Pyle (1990). A mistura da reação conteve 5,5 mL de solução de pectina 0,2% em tampão acetato de sódio 0,025M pH 5,0 contendo 1mM de EDTA e 250µL do extrato enzimático. Após a homogeneização das misturas em agitador de tubo, essas foram incubadas em banho-maria a 50°C por 10 minutos e em seguida a reação foi interrompida colocando-se as amostras em banho de gelo. A leitura foi realizada em viscosímetro de Ostwald tamanho 200, medindo-se o tempo (t) de escoamento das amostras, do branco e da água deionizada, calculando-se a atividade através da fórmula representada abaixo.

$$\% \text{ redução da viscosidade} = \frac{t_{\text{Branco}} - t_{\text{Amostra}}}{t_{\text{Branco}} - t_{\text{Água}}} \times 100$$

$$UV / mL = \frac{\frac{\% \text{ redução viscosidade}}{50} \times 4}{10}$$

A unidade de PG foi expressa em unidades relativas viscométricas (URV) por (mg proteína)⁻¹ por mL⁻¹. URV é definida como 10³ x o tempo em minutos para o decréscimo de 50% da viscosidade relativa da solução.

2.4.5 Proteínas totais e Atividade enzimática específica

Previamente às análises das enzimas citadas anteriormente, foram separadas alíquotas de cada ensaio para determinar o valor de proteínas totais.

As concentrações de proteínas foram medidas espectrofotometricamente em 595 nm através do método de Bradford, usando albumina bovina (BSA, Merck, Alemanha) como padrão e reagente de Bradford (Comassie Blue G-250).

As proteínas presentes no extrato enzimático foram quantificadas para determinar a atividade enzimática específica, a qual representa o índice gerado pela relação entre a atividade enzimática (U/mL) e o valor de proteínas totais (mg/mL) da mesma amostra, ou seja, a atividade enzimática (U) por mg de proteínas (U/mg).

$$U \text{ específico} = \frac{U \text{ enzimático (U / mL)}}{\text{proteínas totais (mg / mL)}}$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigar o efeito das condições de cultivo (pH, tempo e concentração de pectina) sobre a produção de pectinases, foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR). A Tabela 2 apresenta a matriz do delineamento e as respostas obtidas (atividades de PL, PME, Exo-PG e Endo-PG) nas condições de ensaio. Foram observadas diferenças no nível de produção enzimática com as alterações nas condições de cultivo.

Tabela 2 Matriz do delineamento e respostas da atividade enzimática

Ensaios	Tempo (h)	pH	Pectina (g/L)	PL (U/mg)	PME (U/mg)	Exo-PG (U/mg)	Endo-PG (U/mg)
1	43.46	4.11	8.04	1394.17	122.80	0.55	19.93
2	100.54	4.11	8.04	45.92	64.88	0.10	6.90
3	43.46	5.89	8.04	107.33	120.65	0.22	9.29
4	100.54	5.89	8.04	53.60	121.19	0.09	6.44
5	43.46	4.11	16.96	1671.22	14.11	0.64	23.13
6	100.54	4.11	16.96	109.27	0.00	0.48	17.58
7	43.46	5.89	16.96	2214.43	0.00	0.42	9.66
8	100.54	5.89	16.96	861.18	131.02	0.52	8.83
9	24.00	5.00	12.50	2209.01	0.00	0.35	12.12
10	120.00	5.00	12.50	517.13	49.80	0.04	2.92
11	72.00	3.50	12.50	4171.34	0.00	0.59	21.30
12	72.00	6.50	12.50	3475.27	86.05	0.20	5.25
13	72.00	5.00	5.00	219.65	109.54	0.07	5.46
14	72.00	5.00	20.00	277.53	42.11	0.64	20.96
15	72.00	5.00	12.50	530.14	23.30	0.33	12.69
16	72.00	5.00	12.50	467.13	21.95	0.34	12.88
17	72.00	5.00	12.50	529.84	21.82	0.31	12.77
18	72.00	5.00	12.50	465.08	23.30	0.29	12.29
19	72.00	5.00	12.50	472.06	27.34	0.34	12.40
20	72.00	5.00	12.50	472.57	21.94	0.32	12.19

Através dos resultados experimentais obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão e ajustar um modelo quadrático que relaciona a atividade enzimática com os parâmetros estudados. Para todos os casos, um modelo quadrático foi o que melhor descreveu a relação entre as condições de cultivo e as atividades enzimáticas. A Tabela 3 mostra os modelos obtidos e os coeficientes de determinação (R^2) para as enzimas PL, PME, Exo-PG e Endo-PG. A porcentagem de variância explicada (R^2) pelos modelos foi satisfatória para todas as respostas do estudo, indicando boa concordância entre os valores de atividades enzimáticas experimentais e preditos pelos modelos. A partir destes modelos quadráticos foram construídas as curvas de contorno para a visualização das condições mais adequadas de pH, tempo e pectina, que resultaram em máxima produção das enzimas PL, PME, Exo-PG e Endo-PG.

Tabela 3 Modelos preditos para atividade enzimática

Enzima	Modelo predito	R^2
PL	PL = 524.4 -524.4 T +79.9 T ² -84.6 pH +949.9 pH ² +245.6 Pec -313.8 Pec ² +187.9 T.pH -189.1 T.Pec +321.7 pH.Pec	0,825
PME	PME = 22.6 +10.5 T +5.3 T ² +23.1 pH +11.7 pH ² -29.1 Pec +23.3 Pec ² +25.4 T.pH +21.8 T.Pec +7.8 pH.Pec	0,916
Exo-PG	Exo-PG = 3.62 -0.02 T -3.9×10 ⁻⁴ T ² -0.86 pH +0.05 pH ² - 0.06 Pec +2.00 ×10 ⁻³ Pec ² +3.00×10 ⁻³ T.pH +5.11×10 ⁻⁴ Pec +5.00×10 ⁻³ pH.Pec	0,960
Endo-PG	Endo-PG = 61.2-0.3 T -0.002 T ² -13.0pH -0.7 pH ² +1.1Pec +0.03Pec ² +0.07T.pH+0.01T.Pec-0.4pH.Pec	0,948

O diagrama de Pareto (Figura 1a) foi usado para avaliar a significância e o tipo dos efeitos (sinérgico ou antagônico) sobre a atividade enzimática. De acordo com os dados da Figura 1a, todas as variáveis, e também suas interações, foram significativas ($p > 0,05$) na produção da enzima pectina liase (PL). A variável que mais influenciou na produção enzimática foi o tempo de cultivo. O efeito principal desta variável foi negativo, portanto, ao aumentar o tempo de cultivo tem-se uma redução na atividade enzimática. A variável tempo apresentou efeito de interação antagônico à pectina e sinérgico ao pH. Assim, maior atividade de PL (próximo a 7000 U/mg) pode ser obtida em condições de cultivo com menor intervalo de tempo (entre 20 a 40 hrs), menor pH (3,5) e maior concentração de pectina (16 a 20g/L). Em relação ao efeito isolado das outras variáveis, a pectina apresentou efeito positivo e o pH efeito negativo. Como o efeito principal da pectina foi maior que o efeito principal do pH e a interação entre essas variáveis foi positiva (sinérgica) e altamente significativa ($p > 0,05$), pode-se prever que em níveis superiores de pH (acima de 6.5) e pectina (acima de 12.5 g/L) também será observado um pico de produção enzimática (próximo a 5000 U/mg). Uma melhor interpretação das condições ótimas de cultivo considerando a interação entre as 3 variáveis é apresentada através das curvas de contorno (Figuras 1b, 1c e 1d).

De acordo com as curvas de contorno, verificou-se que a enzima PL proveniente de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, pode ser sintetizada em duas condições ótimas de pH, o qual é dependente da concentração de pectina do meio, pois essas variáveis apresentam efeito de interação altamente significativo e sinérgico. Sendo assim, as condições de cultivo que resultaram em níveis máximos de PL (próximo a 7000 U/mg) foram: pH inferior a 3,5, concentrações de pectina entre 4 a 16g/L e tempo de cultivo inferior a 40 horas. Também foi possível obter um pico de PL (próximo a 5000

U/mg) em pH superior a 6,5, porém com uma concentração de pectina maior que 14g/L.

As curvas de contorno indicaram uma redução na atividade enzimática com um prolongamento no tempo de cultivo. Esse declínio na atividade enzimática, após 40 horas de cultivo, pode ter sido causado por algum metabólito inibidor (PALANIYAPPAN et al., 2009) e não pelo esgotamento de nutrientes, pois mesmo suplementando o meio com pectina, o nível de atividade enzimática foi reduzindo com o decorrer do tempo de cultivo.

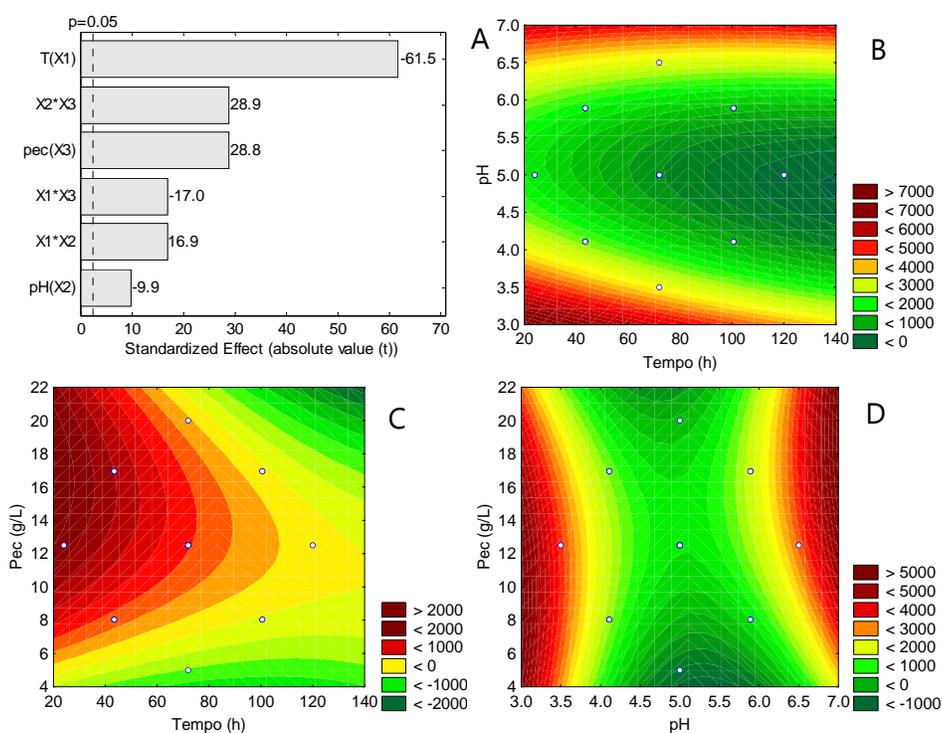


Figura 1 Diagrama de Pareto com efeito do tempo (X1), pH (X2), pectina (X3) e suas interações sobre a produção de Pectina Liase (PL), e curvas de contorno para o teor de PL em função das interações entre as variáveis

Estudo prévios relatam que o pH do meio de cultivo influencia na síntese de pectinases microbiana e uma maior produção da enzima pectina liase (PL) é obtida em valores de pH, entre 5,5-6,2 (MARTÍNEZ-TRUJILLO et al., 2011; TARAGANO; PILOSOFF, 1999). Segundo Banu et al. (2010), o mecanismo pelo qual o pH atua sobre a produção enzimática é bastante complexo e ainda não é totalmente elucidado. Os resultados do presente estudo mostraram que o pH ótimo para a síntese de PL foi influenciado pela concentração de pectina no meio de fermentação, desta forma, foi possível reverter o efeito negativo do pH suplementando o meio com maiores concentrações de pectina (acima de 14g/L) e obter duas condições ótimas de atividade de PL em função do pH, ao invés de uma faixa única.

Em relação a enzima pectinametilsterase (PME), o diagrama de Pareto (Figura 2a) mostra que todas as variáveis, e também suas interações, foram significativas ($p > 0,05$). Dentre essas, as variáveis que mais influenciaram na síntese de PME foram a pectina e o pH. A pectina apresentou efeito principal negativo. O pH e o tempo de cultivo tiveram um efeito principal positivo e um efeito de interação sinérgico. Portanto, a produção de PME foi maximizada em condições de cultivo com níveis superiores de pH (acima de 6,5) e tempo (120 a 140 horas). Essa atividade enzimática é ainda maior quando o meio de cultivo está suplementado com maiores concentrações de pectina (20 a 22g/L), pois as variáveis tempo de cultivo e pectina apresentaram efeito de interação sinérgico. A condição ideal de cultivo que resulta em melhores níveis de atividade enzimática é melhor visualizada através das curvas de contorno (Figura 2b, 2c e 2d).

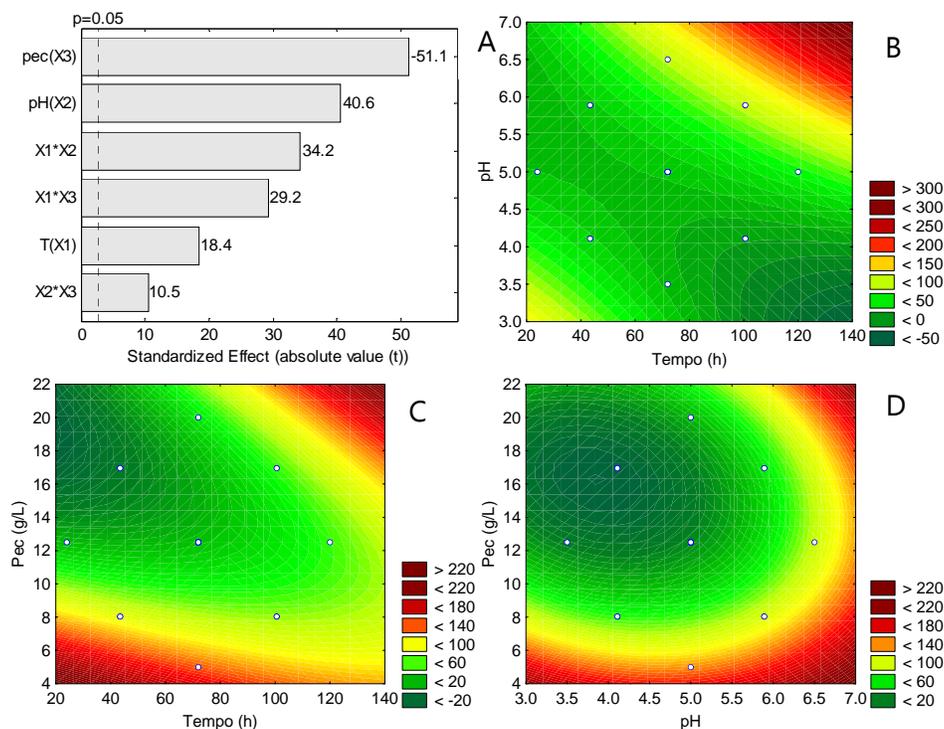


Figura 2 Diagrama de Pareto com efeito do tempo (X1), pH (X2), pectina (X3) e suas interações sobre a produção de Pectinametilsterase (PME) e curvas de contorno para o teor de PME em função das interações entre as variáveis

De acordo com as curvas de contorno (Figura 2b, 2c e 2d), observou-se que nos intervalos estudados, a condição de cultivo que proporcionou uma máxima atividade de PME (acima de 300 U/mg) foi pH acima de 6,5, tempo entre 120 a 140 horas e pectina entre 20 a 22g/L. Níveis inferiores de PME (entre 180 a 220 U/mg) também podem ser alcançados em meio de cultivo com teor reduzido de pectina (4-6g/L), tempo menor que 40 horas e pH inferior a 3,5 ou superior a 6,5.

Tempo de cultivo e pH são amplamente reconhecidos como fatores críticos em processos de fermentação. Eles podem afetar fenômenos fisiológicos individuais, tais como o crescimento dos fungos, esporulação, produção e estabilidade de enzimas (TARAGANO; PILOSOF, 1999). Os resultados deste estudo corroboram essas informações, pois em intervalos de tempo superiores, entre 120 a 140 horas, para manter a produção e estabilidade da enzima PME foi necessário uma quantidade de pectina próxima a 20g/L.

Estudos prévios confirmam estes resultados. Viswanathan e Jagadeeshbabu (2008) estudaram o efeito indutor da pectina em seis espécies de *Aspergillus* e concluíram que a atividade enzimática aumenta de forma significativa com a adição de pectina ao meio de cultivo (20g/L). Martos et al. (2009) observaram em sua pesquisa que a condição ótima para a produção da enzima pectinametilesterase por *Aspergillus niger* é em meio de cultivo suplementado com pectina, na concentração de aproximadamente 20g/L. Baixas concentrações de pectina em meio após 96 horas de cultivo podem resultar em menor rendimento na produção de pectinases, já que são enzimas induzidas pelo substrato pectina (MALVESSI; SILVEIRA, 2004; NAIDU; PANDA, 1998).

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 3), pode-se constatar que todas as variáveis e também suas interações apresentaram efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre a produção de Exo-poligalacturonase (Exo-PG). A pectina foi a variável que mais influenciou na produção de Exo-PG. O efeito isolado dessa variável foi positivo, por isso, quanto maior o nível de pectina no meio de cultivo maior a atividade enzimática. As variáveis tempo e pH apresentaram efeito isolado negativo e efeito de interação sinérgico. Portanto, a enzima Exo-PG é sintetizada, em maior quantidade (1 U/mg), no meio de cultivo com as variáveis tempo e pH em seus níveis inferiores, correspondentes a pH inferior a 3,5 e tempo de cultivo menor que 40 horas. Considerando que o efeito de

interação entre essas duas variáveis e a pectina foi sinérgico, e que a pectina foi a variável que mais influenciou na resposta enzimática, pode-se prever que a enzima Exo-PG também poderá ser sintetizada em níveis superiores de pH (6,0) e tempo (acima de 40 horas), desde que a pectina esteja presente em níveis superiores (20g/L). Uma melhor interpretação das condições ótimas de cultivo considerando a interação entre as 3 variáveis é apresentada através das curvas de contorno (Figura 3b, 3c e 3d).

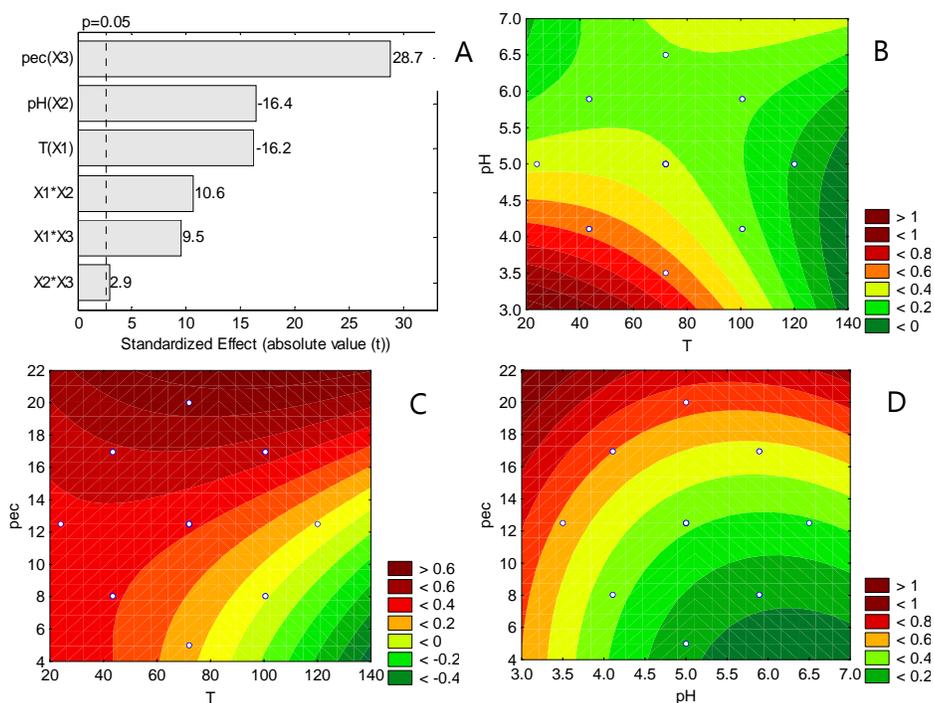


Figura 3 Diagrama de Pareto com efeito do tempo (X1), pH (X2), pectina (X3) e suas interações sobre a produção de Exo-poligalacturonase (Exo-PG) e curvas de contorno para o teor de Exo-PG em função das interações entre as variáveis

As curvas de contorno (Figura 3) indicam que a produção da enzima Exo-PG foi máxima (acima de 1 U/mg) em pH inferior a 3,5, tempo de cultivo menor que 40 horas e pectina superior a 18g/L. Apesar das variáveis pH e tempo apresentarem um efeito isolado negativo, o efeito de interação de cada uma destas variáveis com a pectina foi positivo (sinérgico). Nestas condições, também foi possível observar níveis inferiores de atividade de Exo-PG (próximo a 0,8 U/mg) em pH superior a 6,0 e tempo maior que 40 horas, desde que a concentração de pectina fosse superior a 20g/L.

Os resultados obtidos corroboram a hipótese de que o declínio na atividade enzimática com o decorrer do tempo de cultivo pode ser ocasionado pelo esgotamento de nutrientes, pois foi possível revertê-lo suplementando o meio de cultivo com pectina.

Essas informações são extremamente relevantes para o setor de enzimologia, pois as pesquisas revelam que os microrganismos produtores de pectinases possuem condições ótimas específicas para o seu cultivo e que oscilações nestes valores ótimos, resultam em um declínio na produção enzimática (BANU et al., 2010).

Quanto ao pH, os estudos apontam que a enzima Exo-PG apresenta maior atividade em meio de cultivo com pH inicial ácido para *A. flavipes* FP-500 (MARTÍNEZ-TRUJILLO et al., 2009), *A. oryzae* (MALVESSI; SILVEIRA, 2004), *A. niger* (SHUBAKOV; ANATOLY; ELKINA, 2002), *A. flavipes* FP-500 e *A. terreus* FP-370 (MARTÍNEZ-TRUJILLO et al., 2011) e *A. niger* CH4 (ACUÑA-ARGÜELLES et al., 1995). Quanto ao tempo de cultivo, as poligalacturonases são produzidas principalmente durante a fase de crescimento microbiano (fase log) e, em condições submersas, após um determinado intervalo de tempo específico observa-se uma redução expressiva na atividade enzimática (MARTOS et al., 2009; PALANIYAPPAN et al., 2009;

VISWANATHAN; JAGADEESHBABU, 2008). Nessas condições, a estirpe de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries utilizada nesse trabalho apresentou um comportamento diferente, pois foi capaz de se adaptar em diferentes faixas de pH e tempo de cultivo, mantendo os níveis de produção de Exo-PG, desde que fosse ajustada a concentração de pectina do meio de fermentação.

Em relação a enzima Endo-poligalacturonase (Endo-PG) o diagrama de Pareto (Figura 4a) mostra que todas as variáveis e também suas interações foram significativas ($p > 0,05$). O pH foi a variável que mais influenciou na produção de Endo-PG. O efeito isolado do pH e tempo foi negativo e a interação entre estas variáveis foi sinérgica. Em contrapartida, a pectina teve um efeito principal positivo e uma interação antagônica ao pH e sinérgica ao tempo. Contudo, altos valores de atividade de Endo-PG (próximo a 40 U/mg) são alcançados em meio de cultivo com as variáveis tempo (até 60 horas) e pH (menor que 3,5) em níveis inferiores, combinados com níveis superiores de pectina (acima de 18g/L).

Através das curvas de contorno (Figura 4b, 4c e 4d) pode-se observar que, nos intervalos estudados, a condição de cultivo que resultou em máxima produção de Endo-PG (próximo a 40 U/mg) foi pH inferior a 3,5, tempo de cultivo entre 20 a 60 horas e pectina entre 18g/L a 22g/L. Esses resultados validam a hipótese de que em meio de fermentação submerso, após um intervalo de tempo específico, ocorre uma redução expressiva na atividade enzimática, a qual pode ser ocasionada pelo esgotamento de nutrientes no meio de cultivo e pode ser revertida através do efeito indutor da pectina (MARTOS et al., 2009; PALANIYAPPAN et al., 2009; VISWANATHAN; JAGADEESHBABU, 2008).

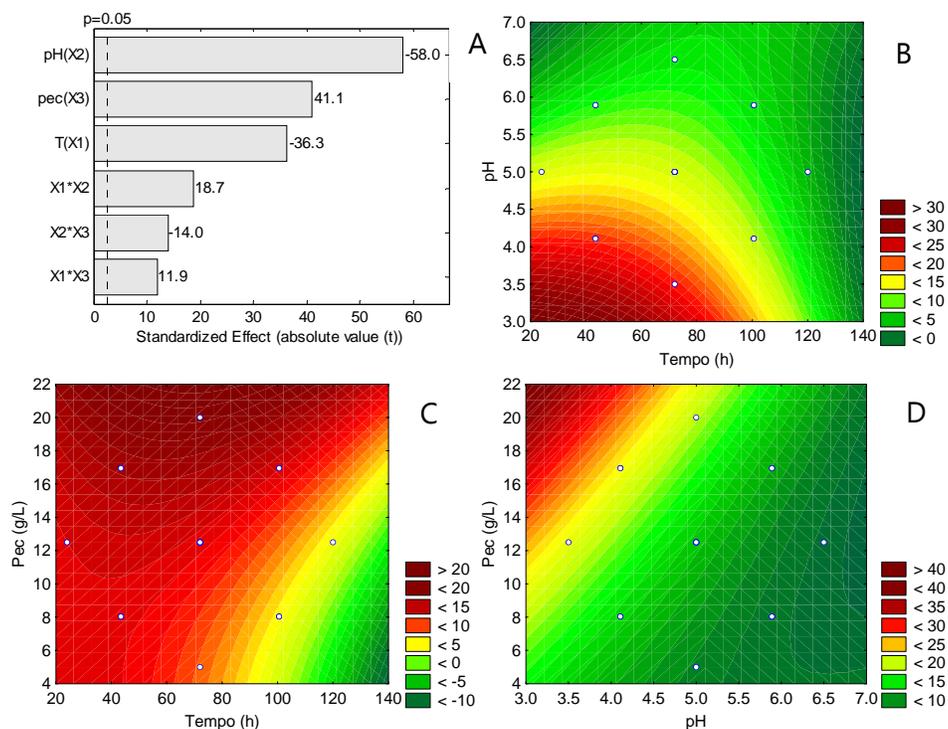


Figura 4 Diagrama de Pareto com efeito do tempo (X1), pH (X2), pectina (X3) e suas interações sobre a produção de Endo-poligalacturonase (Endo-PG) e curvas de contorno para o teor de Endo-PG em função das interações entre as variáveis

A influência negativa do pH inicial do meio de cultivo sobre a produção de Endo-PG e Exo-PG foi consistente com os resultados disponíveis na literatura, onde a maior atividades destas enzimas foram obtidas em meio de cultivo com pH inicial ácido. Acuña-Argüelles et al. (1995) estudaram a estabilidade da enzima poligalacturonase de *Aspergillus niger* CH4, em fermentação submersa com oscilação no pH, e observaram que as enzimas foram rapidamente desnaturadas em valores de pH acima de 5,0. Resultado semelhante

foi observado por Martos et al. (2009), em sua pesquisa com fermentação submersa de *A. niger*, onde a máxima produção de poligalacturonase ocorreu em pH próximo a 4,7, com um declínio na atividade enzimática em pH superior a este.

De acordo com os autores citados acima, a produção de poligalacturonase é cataliticamente ativa em pH ácido. Porém cada microrganismo apresenta uma condição ótima específica de pH que resulta em maiores níveis de atividade enzimática. Isso pode ser atribuído pela diferença nos procedimentos de cultivo, pois o tipo de substrato tem um efeito significativo sobre esses valores, além da alta variabilidade interlaboratorial e aos diferentes mecanismos de ação das pectinases de cada microrganismo (CELESTINO et al., 2006).

Uma discussão mais ampla sobre o efeito de todas as variáveis na síntese de pectinases foi feita através de um estudo por PCA. Esse método foi usado com o objetivo de se ter uma visão global da influência das condições de cultivo sobre a síntese de todas as enzimas. Somente o gráfico de pesos foi avaliado (Figura 5), uma vez que o objetivo dessa análise foi estudar apenas as relações entre as variáveis de condições de cultivo e produção enzimática.

A primeira componente principal (PC1), que explica maior quantidade de variância (46.10%), indica que altos níveis das enzimas Endo-PG, Exo-PG e PL são obtidos em condições de cultivo semelhantes, caracterizadas por maiores concentrações de pectina e menores intervalos de tempo e de pH. A condição de cultivo ideal para a síntese de PME é contrária a esta, a qual é alcançada em valores superiores de pH e tempo e baixa concentração de pectina.

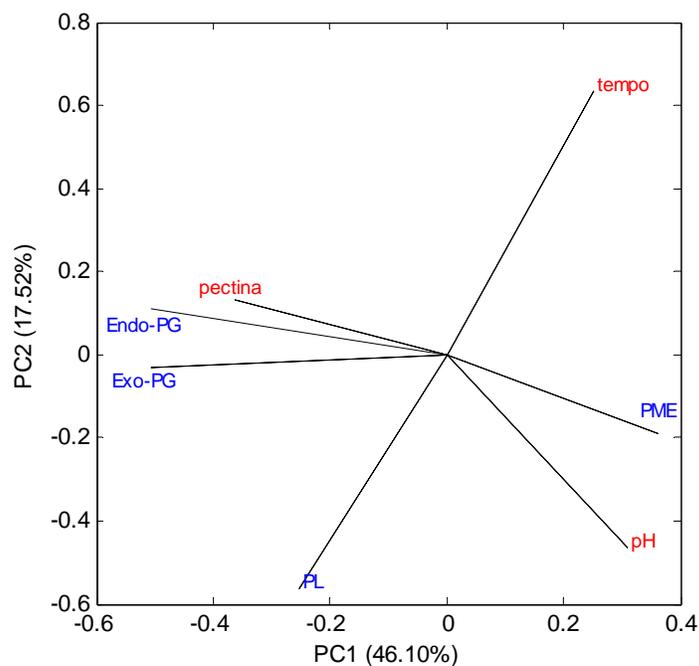


Figura 5 Pesos da PCA para as variáveis tempo de cultivo, pH, pectina e atividade das enzimas PL, PME, Exo-PG e Endo-PG

Essas informações são confirmadas através da análise das curvas de contorno apresentadas anteriormente, pois existe um valor de pH (3,5), tempo (inferior a 40 horas) e pectina (superior a 16g/L) em que as enzimas PL, Exo e Endo-PG tiveram seus picos de atividade e, em contrapartida, a atividade da enzima PME foi mínima. Esses resultados merecem destaque, pois para a indústria de alimentos é desejável microrganismos capazes de sintetizar altos níveis de PL, Exo-PG e Endo-PG e baixos níveis de PME (TARAGANO; PILOSOF, 1999). De acordo com Martos et al. (2009), um extrato enzimático com alta atividade de PL e/ou PG é interessante por acelerar a despolimerização

da molécula de pectina. Por outro lado, uma baixa atividade de PME é vantajosa para o processamento de sucos, pois o metanol liberado pela ação da PME pode prejudicar o teor de ésteres voláteis responsáveis pelo cheiro específico de frutas. O metanol também possui efeito tóxico ao organismo humano, principalmente sobre o sistema nervoso, incluindo nervos ópticos e retina (PEREIRA; ANDRADE, 1998). Além disso, segundo Lang e Dornenburg (2000), para o processamento de alguns alimentos instantâneos para bebês, é conveniente usar preparações comerciais com altos níveis de PG e teores reduzidos de PME, pois a enzima possibilita a maceração do produto sem alterar a cor, o aroma e as vitaminas.

4 CONCLUSÃO

O planejamento experimental por DCCR se confirmou como uma excelente ferramenta para otimizar as condições de cultivo do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, obtendo-se aumento significativo na atividade das enzimas PL, PME, Exo-PG e Endo-PG nas condições ótimas de pH, tempo e pectina.

Foram verificados altos níveis de atividade de PL em duas faixas de pH. Níveis máximos de PL (próximo a 7000 U/mg) foram alcançados em pH inferior a 3,5, concentrações de pectina entre 4 a 16g/L e tempo de cultivo inferior a 40 horas. Nestas condições ótimas de cultivo a síntese de PL aumentou em torno de 68%. Também foi possível obter um pico de PL (próximo a 5000 U/mg) em pH superior a 6,5, porém com uma concentração de pectina maior que 14g/L.

A condição de cultivo que resultou em maior atividade de PME (acima de 300 U/mg) foi pH maior que 6,5, pectina próximo a 20g/L e tempo entre 120 a 140 horas. Nestas condições a atividade de PME aumentou 56%. Níveis inferiores de PME (entre 180 a 220 U/mg) também podem ser alcançados em meio de cultivo com teor reduzido de pectina (4-6g/L), tempo menor que 40 horas e pH inferior a 3,5 ou superior a 6,5.

A produção da enzima Exo-PG foi máxima (acima de 1 U/mg) em pH inferior a 3,5, tempo de cultivo menor que 40 horas e pectina superior a 18g/L. Após a otimização das condições de cultivo a atividade de Exo-PG aumentou 36%.

A atividade de Endo-PG foi maior (40 U/mg) em pH inferior a 3,5, tempo de cultivo entre 20 a 60 horas e concentração de pectina superior a 18g/L. Nestas condições a atividade de Endo-PG aumentou em 73%.

Esses resultados sugerem que o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries apresenta potencial para ser utilizado pela indústria alimentícia, pois existe um valor de pH (3,5), tempo (inferior a 40 horas) e pectina (superior a 16g/L), onde a produção das enzimas PL, Exo e Endo-PG é alta e a produção de PME é mínima.

REFERÊNCIAS

ACUNA-ARGUELLES, M. E. et al. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in sub-merged and solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 43, n. 5, p. 808-814, Sept. 1995.

BANU, A. R. et al. Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. **Indian Journal of Science and Technology**, New Delhi, v. 3, n. 4, p. 377-381, Apr. 2010.

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

CELESTINO, S. M. C. et al. 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.

COSTA, J. A. V. et al. Simultaneous amyloglucosidase and exopolygalacturonase production by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 5, p. 759-766, Sept. 2007.

FAVELA-TORRES, E.; VOLKE-SEPULVEDA, T.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Production of hydrolytic depolymerising pectinases. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 4, p. 221-227, Mar. 2006.

GUMANDI, S. N.; KUMAR, D. S. Enhanced production of pectin lyase and pectate lyase by *Debaryomyces nepalensis* in submerged fermentation by statistical methods. **American Journal of Food Technology**, New York, v. 1, n. 1, p. 19-33, 2006.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 215-227, May 2001.

_____. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp DT7. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 277-282, 2000.

LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, n. 4, p. 366-375, Aug. 2000.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. da. 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, 2004.

MARTINEZ-TRUJILLO, A. et al. Constitutive and inducible pectinolytic enzymes from *Aspergillus flavipes* FP-500 and their modulation by pH and carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 40-47, 2009.

_____. Use of fruit residues for pectinase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 and *Aspergillus terreus* FP-370. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 202-209, Aug. 2011.

MARTOS, M. A. et al. Production of pectinases by *A. niger*: influence of fermentation conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 3, p. 567-572, May/June 2009.

MILLER, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426-428, 1959.

NAIDU, G.; PANDA, T. Production of pectolytic enzymes, a review. **Bioprocess Engineering**, New York, v. 19, n. 1, p. 355-361, Jan. 1998.

PALANIYAPPAN, V. M. et al. Screening of natural substrates and optimization of operating variables on the production of pectinase by submerged fermentation using *Aspergillus niger* MTCC 281. **African Journal of Biotechnology**, Pretoria, v. 8, n. 4, p. 682-686, Aug. 2009.

PEDROLI, D. B. et al. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, London, v. 3, n. 1, p. 9-18, Feb. 2009.

PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. Fontes, reatividade e quantificação de metanol e etanol na atmosfera. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 744-754, nov./dez. 1998.

PHUTELA, U. et al. 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.

ROMBOUITS, F. M.; PILNIK, W. Pectic enzymes. In: ROSE A. H. (Ed.). **Microbial enzymes and bioconversions**. London: Academic, 1980. p. 227-272.

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

SCHWAN, R.; ROSE, A. H. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 62-67, Feb. 1994.

SHUBAKOV, A.; ANATOLY, A.; ELKINA, E. A. Production of polygalacturonases by filamentous fungi *Aspergillus niger* ACMF-1119 and *Penicillium dierckxii* ACIMF-152. **Chemistry and Computational Simulation**, Moscow, v. 2, n. 7, p. 65-68, July 2002.

STATISTICA. **Statistica 5.1 software**. Tucks, 1995. Software.

TARAGANO, V. M.; PILOSOFF, A. M. R. Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 25, n. 3/5, p. 411-419, Aug. 1999.

VISWANATHAN, R.; JAGADEESHBABU, P. E. Studies on the production of pectinase from tamarind kernel powder by submerged fermentation using *Aspergillus* species and optimization of medium using design expert. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, Lausanne, v. 22, n. 4, p. 481-489, 2008.

YUGHANDAR, N. M. et al. Optimization of pectinase production from *Manihot utilissima* by *Aspergillus niger* NCIM 548 using statistical

experimental design. **Research Journal of Microbiology**, New York, v. 3, n. 1, p. 9-16, Mar. 2008.

CAPÍTULO 3: Extração e purificação parcial de pectinases obtidas de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries

RESUMO

O estudo objetivou purificar parcialmente as enzimas pectina liase (PL), pectinametilesterase (PME), exo-poligalacturonase (exo-PG) e endo-poligalacturonase (endo-PG), obtidas de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries em condições submersas, utilizando método simples e de baixo custo, através da precipitação com sulfato de amônio e posterior diálise. O sulfato de amônio foi utilizado como agente precipitante na concentração de 50, 60, 70 e 80%. As enzimas PL, PME, exo-PG e endo-PG foram extraídas em maior quantidade com 60% de sulfato de amônio, obtendo índices de purificação equivalentes a 8,1; 7,6; 7,8 e 8,4, respectivamente. A porcentagem de recuperação destas enzimas no decorrer das etapas de purificação foi superior a 90%, o que denota um alto rendimento. A metodologia de purificação se mostrou útil e válida, por seu baixo custo, facilidade de aplicação e eficiência do processo.

Palavras-chave: Pectina liase. Pectinametilesterase. Exo-poligalacturonase. Endo-poligalacturonase. Purificação.

ABSTRACT

The study aimed to partially purify the enzymes pectin lyase (PL), pectinmethylesterase (PME), exo-polygalacturonase (exo-PG) and endo-polygalacturonase (endo-PG), obtained from *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries under submerged conditions, utilizing simple and low cost method through the precipitation with ammonium sulfate and posterior dialysis. Ammonium sulfate was utilized as a precipitant agent at the concentration of 50, 60, 70 and 80%. The enzymes PL, PME, exo-PG and endo-PG were extracted in greater amount with 60% ammonium sulfate, obtaining purification indices equivalent to 8.1; 7.6; 7.8 and 8.4, respectively. The percentage of recovery of these enzymes over the purification steps was higher than 90%, which denotes a high output. The purification methodology proved useful and valid for its low cost, ease of application and process efficiency.

Keywords: Pectinmetilesterase. Pectin lyase. Exo-polygalacturonase. Endo-polygalacturonase. Purification.

1 INTRODUÇÃO

As enzimas microbianas têm aplicações tecnológicas em diferentes processos industriais. Entre as várias enzimas comercializadas, muitas são produtos de fermentação de fungos filamentosos (PICCOLI-VALLE et al., 2001). As pectinases possuem várias aplicações biotecnológicas e estão sendo utilizadas com frequência pela indústria de alimentos, com destaque para o processamento de sucos e produção de vinhos (JACOB; PREMA, 2006), com a finalidade de reduzir a viscosidade e favorecer a clarificação. A maioria dessas pectinases usadas nas indústrias nacionais é adquirida do mercado exterior. Na tentativa de aumentar a produção comercial dessas enzimas no Brasil, muitos microrganismos têm sido estudados quanto ao seu potencial em sintetizar pectinases, como *Aspergillus* sp. (ARGÜELLES, 1995), *Penicillium* spp. (SILVA et al., 2002), *Fusarium* spp. (NITURE; PANT, 2004), *Rhizopus oryzae* (SAITO et al., 2004), *Thermoascus aurantiacus* (MARTINS et al., 2002), *Trichoderma reesei* (OLSSON et al., 2003), dentre outros.

Para a utilização industrial dessas pectinases microbianas, é essencial obter um material enzimático com maior grau de pureza, obtido através das etapas de purificação enzimática. São inúmeras as técnicas usadas para a purificação de determinada enzima, no entanto, muitas delas são dispendiosas, o que dificulta a obtenção da enzima purificada em grande escala para comercialização. Sendo assim, o uso de métodos de purificação enzimática simples que resultem em um produto enzimático de baixo custo e com características desejáveis à indústria, tem sido o foco de muitas pesquisas (BANU et al., 2010; MALVESSI; SILVEIRA, 2004; PHUTELA et al., 2005).

A purificação e o avanço do conhecimento sobre as propriedades bioquímicas das pectinases são essenciais para pesquisas relacionadas ao seu

modo de ação e para uma aplicação industrial mais eficiente (SILVA et al., 2007). Uma análise da atividade enzimática no extrato enzimático bruto é inviável para determinar se o microrganismo é um bom produtor de pectinases, devido a possível existência de um sistema multi enzimático trabalhando em sinergismo para a degradação do substrato. Além disso, a utilização de enzimas em indústrias, tais como as de processamento de alimentos, requer uma solução enzimática livre de interferentes, a fim de evitar mudanças indesejáveis nos alimentos causadas por contaminantes presentes no extrato enzimático bruto. A preparação enzimática purificada também elimina substâncias que podem atuar como inibidores enzimáticos e toxinas (PEDROLLI; CARMONA, 2010).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi purificar parcialmente as pectinases do fungo *Cladosporium cladosporioides* (fres.) de Vries, em fermentação submersa, utilizando métodos simples e de baixo custo, na tentativa de isolar as enzimas pectina liase (PL), pectinametilesterase (PME), exopoligalacturonase (Exo-PG) e endopoligalacturonase (Endo-PG) para sua posterior caracterização quanto às condições de estabilidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação do experimento

O fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries foi cultivado e inoculado ao meio de cultivo no Laboratório de Microbiologia da EPAMIG. O processo de purificação enzimática parcial e as análises para determinação da atividade enzimática foram realizados no Laboratório de Enzimas do Setor de Microbiologia, no Departamento de Biologia (DBI). Todos esses laboratórios estão situados na Universidade Federal de Lavras - UFLA.

2.2 Microrganismo utilizado e condições de cultivo

O microrganismo *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, isolado de grãos de café e mantido em ágar nutriente a 4°C, conforme descrito no item 2.2 do capítulo 2, foi inoculado ao meio de cultivo na concentração de $1,03 \times 10^7$ esporos/ml. A técnica de preparo do meio de cultivo e do inóculo foi a mesma descrita no capítulo 2 item 2.2. Foram usados 32 ml da suspensão de esporos e 800 ml de meio de cultura frio previamente esterilizado. Este meio de cultura foi dividido em 8 partes e transferido para frascos Erlenmeyer de 250 ml, contendo 100 ml de meio em cada frasco. Os frascos foram armazenados em incubadora orbital, onde a fermentação submersa foi conduzida a 28 °C sobre agitação constante (175 rpm).

O meio de cultura utilizado foi composto de NaNO₃ (2,0g), KH₂PO₄ (0,5g), K₂HPO₄ (0,5g), (NH₄)₂SO₄ (0,5g), KCl (0,05g), MgSO₄.7H₂O (0,1g), FeSO₄ (0,0005g), ZnSO₄ (0,007g), peptona (0,1g), extrato de levedura (0,2g) e solução de vitaminas (1,0ml). A dissolução dos sais foi feita em 100 ml de água destilada. A solução de vitaminas é composta de ácido nicotínico (100 mg),

ácido ρ -aminobenzóico (10 mg), biotina (0,2 mg), piridoxina (50 mg), riboflavina (100 mg) e tiamina (50 mg). As vitaminas, nestas proporções, foram solubilizadas em água destilada previamente esterilizada (100 ml).

As variáveis tempo de cultivo (horas), pH e concentração de pectina (g/L) foram fixadas em níveis que resultaram em máxima síntese de Endo-PG, Exo-PG e PL, de acordo com os estudos do capítulo anterior. Esses níveis correspondem a 40 horas de cultivo, pH 3,5 e concentração de pectina igual a 20g/L.

2.3 Obtenção do extrato enzimático bruto

Ao término do tempo de fermentação (90 horas) o meio foi filtrado em papel filtro (Whatman n°1). O filtrado obtido foi centrifugado a $7.840 \times g$ durante 10 minutos a 5°C , obtendo-se o extrato enzimático bruto. Parte desse extrato enzimático bruto (40 mL) foi reservado à 4°C para determinar o teor de proteínas totais e atividade de pectinametilsterase (PME), pectilase (PL), exo-poligalacturonase (Exo-PG) e endo-poligalacturonase (Endo-PG). As determinações foram feitas em triplicata.

O restante do extrato enzimático bruto (760 ml) foi usado para a precipitação enzimática.



Figura 1 Extrato enzimático bruto

2.4 Precipitação enzimática

As enzimas presentes no extrato enzimático bruto ou inicial foram precipitadas com sulfato de amônio nas saturações de 50, 60, 70 e 80%. Os ensaios foram conduzidos em triplicata. O sulfato de amônio foi adicionado aos poucos e a solução foi homogeneizada lentamente com um bastão de vidro. Todo esse processo foi realizado em banho de gelo, mantendo a temperatura em aproximadamente 4°C. Após a adição do sulfato de amônio, a solução foi mantida em refrigerador à 4°C durante 24 horas, conforme descrito por Dias et al. (2008). A Figura 2 ilustra o extrato enzimático bruto com as enzimas em precipitação.

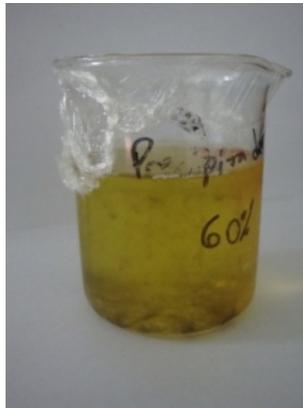


Figura 2 Extrato enzimático bruto com adição de 60% de sulfato de amônio após 24 horas de refrigeração à 4°C

Terminado o período de repouso em geladeira, a solução foi centrifugada à 4°C, 14000 ×g durante 20 minutos. Com a centrifugação foi possível obter duas fases: sobrenadante e precipitado. A fração sobrenadante foi estocada a 4°C para posterior quantificação de proteínas totais, pectinametilesterase (PME), pectilase (PL), exo-poligalacturonase (Exo-PG) e endo-poligalacturonase (Endo-PG). O precipitado foi submetido ao processo de diálise conforme descrito posteriormente.

As concentrações de sulfato de amônio são geralmente expressas em % de saturação. Para a determinação da quantidade em gramas de sulfato de amônio a ser adicionado na solução, utilizou-se a fórmula de Peralta, Terenzi e Jorge (1990). A equação determina a quantidade M em gramas, de sulfato de amônio necessário para fazer 1 litro de solução:

$$M = \frac{533 (S1 - S0)}{100 - 0,32 S1}$$

S1= saturação final desejada S0= saturação inicial

2.5 Diálise da solução enzimática

O precipitado resultante da etapa anterior foi ressuspendido em 100 ml de solução tampão tris-HCl pH 7,5 e em seguida transferido para os sacos de diálise (Inlab) com cutt-off de 12 Kda, considerando que as pectinases em estudo possuem um peso molecular superior a este.

A diálise foi realizada em geladeira à 4°C, durante 48 horas, conforme descrito por Dias et al. (2008). Os sacos de diálise foram imersos na solução tampão tris-HCl pH 7,5 para promover a dessalinização da amostra. O volume de solução tampão usado foi 50 vezes o volume do precipitado

enzimático ressuspendido. Essa solução tampão foi trocada periodicamente (cada 6 horas). A Figura 3 ilustra o processo de diálise.

Após 48 horas de diálise, a solução enzimática foi homogeneizada em béquer e em seguida centrifugada à 4°C, 14000 ×g durante 20 minutos, para obtenção da enzima parcialmente purificada e posterior determinação das atividades enzimáticas.

2.6 Determinação da Atividade Enzimática

As atividades enzimáticas foram determinadas em triplicata nas frações extrato enzimáticas bruto, sobrenadante resultante da saturação com sulfato de amônio e solução enzimática parcialmente purificada.

2.6.1 Pectinametilesterase (PME)

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Schwan e Rose (1994). Uma solução de pectina cítrica a 1% (m/v) foi preparada em NaCl 0,1M, ajustando-se o pH da solução para 7,5 com NaOH 0,5M. Uma alíquota de 3 mL da solução de enzimas e 20 mL da solução de pectina cítrica foram adicionados em Erlenmeyer de 50 mL, sendo a mistura incubada durante 30 minutos, mantendo o pH em 7,5 pela adição de NaOH 0,02M. A atividade de PME foi estimada proporcionalmente ao volume de NaOH gasto na titulação e expressa em microequivalentes de ácido péctico liberado por mL⁻¹ h⁻¹. Uma unidade de pectinametilesterase (U) foi definida como a quantidade de enzima que liberou um microequivalente de ácido péctico por hora de reação.

2.6.2 Pectina liase (PL)

A atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Kashyap et al. (2000). Uma alíquota de 1 ml da solução enzimática foi adicionada a 5mL da solução de pectina (1% m/v). O volume foi ajustado para 10 mL com água destilada. As amostras foram incubadas a 40°C por 2h e em seguida foi adicionado 0,6mL de sulfato de zinco 9% e 0,6 mL de hidróxido de sódio 0,5 M. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm/10 min) e 5 mL do sobrenadante foi adicionado a uma mistura de ácido tiobarbitúrico (3 mL, 0,04 M), HCl (2,5 mL, 0,1 M) e água destilada (0,5 mL). A mistura foi aquecida em banho-maria em ebulição por 30 minutos, resfriada à temperatura ambiente e a absorbância da solução foi lida a 550 nm. Uma unidade de atividade (U) foi dada como a quantidade de enzima que provocou uma alteração na absorbância de 0,01 na condição do ensaio.

2.6.3 Exo-poligalacturonase (Exo-PG)

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Schwan e Rose (1994). Uma curva de calibração para o ácido poligalacturônico foi construída utilizando o método de Miller (1959). Em um tubo de ensaio foi adicionado 1,5 mL da solução de enzimas e 1,0 mL de solução de sal sódico de ácido poligalacturônico a 0,1% em tampão citrato 0,1M pH 5,0. A mistura foi incubada em banho-maria a 40°C por 1 hora e após esse período a reação foi paralisada adicionando-se 1,5 mL de solução de ácido 3,5- dinitrossalicílico (DNS), sendo os tubos mantidos em banho fervente por 5 minutos e, em seguida, resfriados em banho de gelo. A absorbância da solução foi lida a 575nm.

A atividade (U) de Exo-PG foi expressa na forma de μmol de equivalentes de ácido galacturônico liberados por mL por minuto nas condições do ensaio.

2.6.4 Endo-poligalacturonase (Endo-PG)

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Barnby, Morpeth e Pyle (1990). A mistura da reação conteve 5,5 mL de solução de pectina 0,2% em tampão acetato de sódio 0,025M pH 5,0 contendo 1mM de EDTA e 250 μL do extrato enzimático. Após a homogeneização das misturas em agitador de tubo, essas foram incubadas em banho-maria a 50°C por 10 minutos e em seguida a reação foi interrompida colocando-se as amostras em banho de gelo. A leitura foi realizada em viscosímetro de Ostwald tamanho 200, medindo-se o tempo (t) de escoamento das amostras, do branco e da água deionizada, calculando-se a atividade segundo a fórmula representada abaixo.

$$\% \text{ redução da viscosidade} = \frac{t_{\text{Branco}} - t_{\text{Amostra}}}{t_{\text{Branco}} - t_{\text{Água}}} \times 100$$

$$UV / mL = \frac{\% \text{ redução viscosidade}}{50} \times 4$$

A unidade de PG foi expressa em unidades relativas viscométricas (URV) por $(\text{mg proteína})^{-1}$ por mL^{-1} . URV é definida como $10^3 \times$ o tempo em minutos para o decréscimo de 50% da viscosidade relativa da solução.

2.7 Proteínas totais e atividade enzimática específica

Previamente às análises das enzimas citadas anteriormente, foram separadas alíquotas de cada ensaio para determinar o valor de proteínas totais. As concentrações de proteínas foram medidas espectrofotometricamente em 595 nm através do método de Bradford (1976), usando albumina bovina (BSA, Merck, Alemanha) como padrão e reagente de Bradford (Comassie Blue G-250).

As proteínas presentes no extrato enzimático foram quantificadas para determinar a atividade enzimática específica, a qual representa o índice gerado pela relação entre a atividade enzimática (U/mL) e o valor de proteínas totais (mg/mL) da mesma amostra, ou seja, a atividade enzimática (U) por mg de proteínas (U/mg).

$$U \text{ específico} = \frac{U \text{ enzimático (U / mL)}}{\text{proteínas totais (mg / mL)}}$$

2.8 Cálculo do rendimento e índice de purificação

Após a purificação enzimática parcial, foi calculado o rendimento e índice de purificação, conforme descrito por Sharma e Gupta (2001), através as fórmulas descritas abaixo.

$$\text{Rendimento} = \frac{U \text{ enzimático purificado (U / mL)}}{U \text{ enzimático extratobruto (U / mL)}} \times 100$$

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.

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

O índice de purificação é mais preciso na quantificação da atividade enzimática durante as etapas de purificação, pois utiliza a atividade enzimática específica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a utilização industrial de pectinases microbianas, é essencial obter um material enzimático livre de interferentes. O presente estudo utilizou uma técnica simples de purificação parcial, composta de precipitação com sulfato de amônio em diferentes concentrações e posterior diálise.

A concentração de sulfato de amônio foi um parâmetro crítico e determinante no processo de extração enzimática. Observou-se que as enzimas em estudo, PME, PL, exo-PG e endo-PG, precipitaram-se em uma concentração específica de sulfato de amônio. De acordo com Sharma e Gupta (2001), este resultado é almejado em estudos de purificação enzimática, pois a quantidade de sulfato de amônio deve ser suficiente para se obter apenas a proteína de interesse.

A Figura 1 mostra a atividade enzimática específica antes e após a purificação da enzima pectina liase (PL) e também o índice de purificação dessa enzima em diferentes concentrações de sulfato de amônio. De acordo com a figura, a saturação com 60% de sulfato de amônio, resultou em maiores níveis de precipitação da enzima PL e, portanto, um pico de atividade enzimática. A atividade enzimática que no extrato inicial correspondia a 2155,8 U/mg, aumentou para 17483 U/mg após o processo de purificação parcial. Com a técnica de purificação parcial foi possível recuperar 94% da enzima presente no extrato enzimático inicial e obter um índice de purificação equivalente a 8,1, ou seja, a atividade da enzima PL aumentou cerca de 8 vezes.

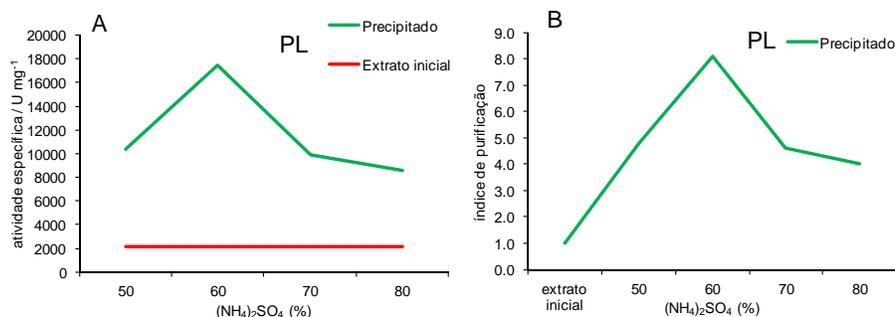


Figura 1 Atividade enzimática específica (A) e índice de purificação (B) da enzima pectina liase (PL) em diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nas frações extrato enzimático inicial e precipitado enzimático

De acordo com a Figura 2, a enzima pectinametilsterase (PME) também foi extraída em maior quantidade com sulfato de amônio na saturação de 60%. A atividade dessa enzima que, no extrato enzimático bruto foi 7,1 U/mg, aumentou para 53,7 U/mg após a precipitação. Com a técnica de purificação parcial utilizada, 90,6% da enzima presente no extrato enzimático inicial foi recuperada e um índice de purificação significativo, equivalente a 7,6, foi alcançado.

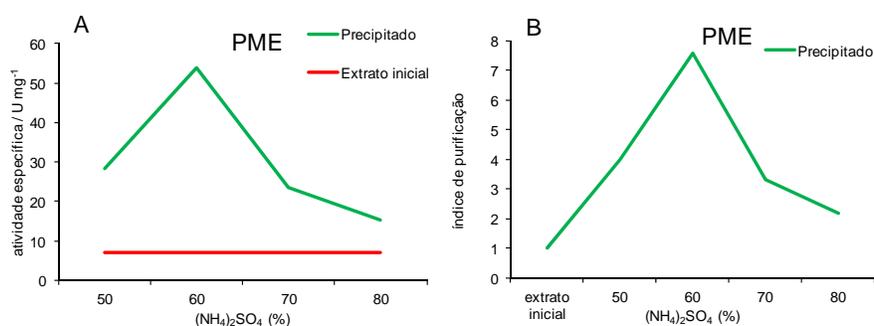


Figura 2 Atividade enzimática específica (A) e índice de purificação (B) da enzima pectinametilsterase (PME) em diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, nas frações extrato enzimático inicial e precipitado enzimático

O comportamento das enzimas exo-poligalacturonase (Exo-PG) e endo-poligalacturonase (Endo-PG), quanto à concentração ideal de sulfato de amônio que resulta em maior precipitação enzimática, foi semelhante ao das enzimas descritas anteriormente. De acordo com a Figura 3, com 60% de saturação de sulfato de amônio foi possível aumentar a atividade da enzima Exo-PG de 1,8 U/mg para 14 U/mg, obtendo um índice de purificação de 7,8. A metodologia de purificação parcial permitiu recuperar 93% da enzima presente no extrato enzimático inicial.

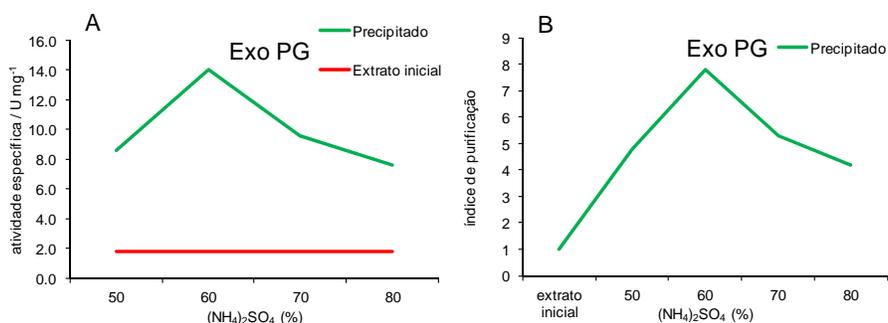


Figura 3 Atividade enzimática específica (A) e índice de purificação (B) da enzima Exo-poligalacturonase (Exo-PG) em diferentes concentrações de (NH₄)₂SO₄, nas frações extrato enzimático inicial e precipitado enzimático

A enzima endo-PG, que também foi extraída em maior quantidade com 60% de sulfato de amônio, foi a enzima que obteve maior índice de purificação, equivalente a 8,4. Esse índice indica que foi possível aumentar 8 vezes a atividade enzimática com a técnica de purificação parcial utilizada, obtendo uma atividade final de endo-PG igual a 471 U/mg. A Figura 4 ilustra esse pico de

atividade enzimática com 60% de sulfato de amônio. Uma elevada porcentagem de recuperação da enzima endo-PG, correspondente a 97%, foi obtida com a técnica de purificação parcial.

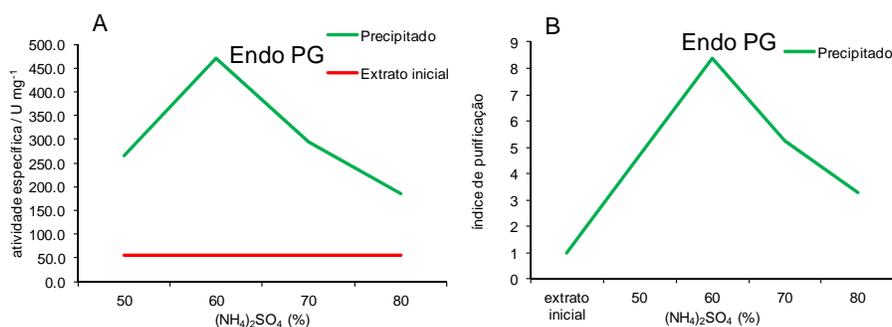


Figura 4 Atividade enzimática específica (A) e índice de purificação (B) da enzima endo-poligalacturonase (Endo-PG) em diferentes concentrações de (NH₄)₂SO₄, nas frações extrato enzimático inicial e precipitado enzimático

Segundo os resultados apresentados acima, uma saturação com 60% de sulfato de amônio foi suficiente para remover a água de hidratação das moléculas de pectinases, reduzindo sua solubilidade e resultando em um precipitado enzimático. Os valores obtidos encontram-se dentro da variação proposta por Buga et al. (2010), os quais relatam que as pectinases podem se precipitar com uma concentração de sulfato de amônio entre 0-90%, dependendo da fonte enzimática. Vovk e Simonovska (2007) utilizaram a técnica de saturação com sulfato de amônio entre 30 a 80% como uma das etapas de purificação das enzimas poligalacturonase e pectinametilesterase, e observaram

que estas enzimas foram extraídas em maior quantidade com 60% de saturação do meio com sulfato de amônio.

A Tabela 1 mostra o comportamento das enzimas PL, PME, exo-PG e endo-PG durante o processo de purificação parcial com sulfato de amônio a 60%. Nota-se que com a técnica de purificação enzimática utilizada neste estudo foi possível recuperar mais de 90% das enzimas presentes no extrato enzimático inicial e obter níveis significativos de índice de purificação. A metodologia empregada permitiu remover pigmentos provenientes do processo de fermentação e também algumas proteínas que não são de interesse, aumentando assim a concentração das enzimas presentes no extrato enzimático bruto ou inicial.

Tabela 1 Dados de purificação das enzimas PL, PME, Exo PG e Endo PG na concentração de 60% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Enzimas	AE (U) extrato inicial	AE específica (U/mg) extrato inicial	AE (U) purificação parcial*	AE específica (U/mg ⁻¹) purificação parcial*	Rendimento (%)	IP
PL	1854.2	2155.8	1748.3	17483	94.3	8.1
PME	6.07	7.1	5.5	53.70	90.6	7.6
Exo-PG	1.5	1.8	1.4	14	93.3	7.8
Endo-PG	48.3	56.2	47.1	471	97.5	8.4

*Os dados de atividade enzimática após a purificação parcial referem-se à saturação com 60% de sulfato de amônio. A quantidade de proteína no extrato bruto e na solução enzimática parcialmente purificada foi equivalente a 0.86 mg e 0.08 mg, respectivamente.

Apesar desses valores de rendimento e índice de purificação não serem muito próximos a outros relatados na literatura, pode-se dizer que os resultados obtidos corroboram os dados de alguns estudos, uma vez que pode haver uma alta variabilidade interlaboratorial entre os ensaios e também pelo fato das pectinases diferirem umas das outras de acordo com a fonte microbiana (BANU et al., 2010; JACOB; PREMA, 2006; PEDROLI; CARMONA, 2010).

Sharma e Gupta (2001) também obtiveram índices satisfatórios de purificação enzimática (10) e rendimento (76%) utilizando apenas a metodologia de precipitação enzimática com 30% de sulfato de amônio para purificar parcialmente a enzima poligalacturonase proveniente de *Aspergillus niger*.

A enzima poligalacturonase obtida de *Aspergillus niger* (SA6) foi parcialmente purificada utilizando a precipitação com sulfato de amônio, entre 40-80%, como uma das etapas de purificação enzimática. A maior atividade da enzima (0,78 U/mg) foi obtida com 70% de saturação com sulfato de amônio, alcançando um índice de purificação igual a 9 (BUGA et al., 2010).

A enzima poligalacturonase de *Sporotrichum thermophile* Apinis foi purificada 9 vezes através da saturação do extrato enzimático com 30% de acetona. A porcentagem de recuperação da enzima através deste processo foi de 22,18% (KAUR; KUMAR; SATYNARAYANA, 2004).

De acordo com a literatura, grande parte dos estudos de purificação enzimática envolve etapas cromatográficas. Celestino et al. (2006) purificaram, a um índice de 9,37, uma pectinase produzida por *Acrophialophora nainiana*. A enzima foi recuperada 60,6% após três etapas de purificação: Sephacryl S-100 gel filtração, DEAE-Sepharose de troca iônica e filtração com Sephadex G-50.

Pectinase sintetizada por *Penicillium chrysogenum*, em fermentação submersa, foi purificada através de precipitação com etanol e etapa cromatográfica, obtendo um índice de purificação de 4.45 através da

precipitação com etanol e 17,24 por cromatografia. O rendimento obtido nessas etapas foi de 58% e 48%, respectivamente (BANU et al., 2010).

A enzima poligalacturonase obtida de *Penicillium viridicatum* RFC por fermentação em estado sólido foi purificada pelo tratamento com caolin e ultrafiltração, seguido de cromatografia em coluna Sephadex G50. Através desse processo de purificação foi possível alcançar um índice de purificação igual a 22,2 e uma atividade enzimática final de 1000 U/mg. Esse processo de purificação teve um rendimento de 24,7% (SILVA et al., 2007).

Yadav et al. (2009) purificaram uma pectina liase secretada por *Penicillium citrinum* através de duas etapas cromatográficas em colunas Sephadex G100 e DEAE-cellulose, obtendo atividade enzimática específica de 12,9 U/mg, um índice de purificação de 8,6 e rendimento de 32,3%.

Uma pectina liase obtida de *Aspergillus flavus* MTCC 7589 foi purificada usando fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca aniônica em DEAE celulose e cromatografia de filtração em gel em Sephadex G-100. Após estas 3 etapas de purificação, foi possível aumentar a atividade enzimática específica em 58 vezes. No entanto, uma quantidade significativa da enzima se perdeu durante o processo de purificação, pois o rendimento deste processo foi de apenas 10,29%. É importante ressaltar que dentre todas as etapas de purificação, a que foi mais eficiente na recuperação das enzimas presentes no extrato enzimático inicial, foi a precipitação com sulfato de amônio, com um rendimento equivalente a 31,5% (YADAV et al., 2008).

Conforme foi relatado nos estudos acima, a maioria dos métodos de purificação enzimática que resultam em maiores índices de purificação envolvem etapas cromatográficas. No entanto, observou-se que métodos de purificação mais complexos estão associados com perdas enzimáticas indesejáveis durante o processo de purificação. Em algumas pesquisas a

porcentagem de recuperação enzimática foi menor que 50% (BANU et al., 2010; BARENSE et al., 2001; CELESTINO et al., 2006; CONTREAS-ESQUIVEL; VOGET, 2004; KOBAYASHI et al., 2001; SAITO et al., 2004; SEMENOVA et al., 2003; SILVA et al., 2007; YADAV et al., 2009) e, ocasionalmente, menor que 1% (CABANNE; DONÉCHE, 2002; NITURE; PANT, 2004). Estas perdas são significativas e causadas principalmente pelo elevado número de passos utilizados na purificação, os quais também aumentam o custo do processo de purificação e inviabilizam a aplicação das enzimas obtidas em escala industrial (PEDROLI; CARMONA, 2010).

Diante do problema apresentado acima, a metodologia de purificação parcial utilizada neste estudo foi bastante eficiente, resultando em alta porcentagem de recuperação enzimática (maior que 90%) e valores satisfatórios de índice de purificação, os quais podem ser até comparados com aqueles onde se utilizou etapas cromatográficas no processo de purificação. Além disso, esta metodologia de purificação parcial é simples e possui baixo custo, podendo ser aplicada em grande escala para fins comerciais.

4 CONCLUSÃO

Através da técnica de precipitação com sulfato de amônio à 60% de saturação e posterior diálise da enzima precipitada, foi possível concentrar as enzimas PL, PME, exo-PG e endo-PG, resultando em uma solução enzimática parcialmente purificada.

A porcentagem de recuperação destas enzimas no decorrer das etapas de purificação foi superior a 90%. Esse alto rendimento obtido através de metodologia simples de separação enzimática gerada num meio extremamente econômico, associada ao valor desta enzima para o setor alimentício, denotam relevância para o presente estudo. A metodologia de purificação se mostrou útil e válida, por seu baixo custo, facilidade de aplicação e eficiência do processo.

REFERÊNCIAS

ACUNA-ARGUELLES, M. E. et al. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in sub-merged and solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 43, n. 5, p. 808-814, Sept. 1995.

BANU, A. R. et al. Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. **Indian Journal of Science and Technology**, New Delhi, v. 3, n. 4, p. 377-381, Apr. 2010.

BARENSE, R. I. et al. Partial purification and characterization of exopolygalacturonase II and III of *Penicillium frequentans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 327-330, Oct./Dec. 2001.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analysis Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUGA, C. et al. Partially purified polygalacturonase from *Aspergillus niger* (SA6). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 52, p. 8944-8954, Dec. 2010.

CABANNE, C.; DONÉCHE, B. Purification and characterization of two isozymes of polygalacturonase from *Botrytis cinerea*: effect of calcium ions on polygalacturonase activity. **Microbiological Research**, Jena, v. 157, n. 3, p. 183-189, 2002.

CELESTINO, S. M. C. et al. 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.

CONTREAS-ESQUIVEL, J. C.; VOGET, C. E. Purification and partial characterization of an acid polygalacturonase from *Aspergillus kawakii*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 21-28, Jan. 2004.

DIAS, A. et al. Alkaline protease from *Bacillus* sp. isolated from coffee bean grown on cheese whey. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 10, p. 2027-2034, Dec. 2008.

JACOB, N.; PREMA, P. Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 2, p. 263-267, 2006.

KASHYAP, D. R. et al. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp DT7. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 277-282, 2000.

KOBAYASHI, T. et al. Purification and properties of a galacturonic acid-releasing exopolygalacturonase from a strain of *Bacillus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 65, n. 4, p. 842-847, Apr. 2001.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. da. 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, 2004.

MARTINS, E. S. et al. Solid-state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, London, v. 37, n. 9, p. 949-954, Apr. 2002.

MILLER, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426-428, 1959.

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

OLSSON, L. et al. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 33, n. 5, p. 612-619, Oct. 2003.

PEDROLI, D. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hamphisre, v. 37, n. 6, p. 567-573, June 2010.

PERALTA, D.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A. β -D-Glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetics characterization of a multifunctional enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 1033, n. 3, p. 243-249, Mar. 1990.

PHUTELA, U. et al. 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.

PICCOLI-VALLE, D. et al. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 135-140, 2001.

SAITO, A. et al. Purification of the extracellular pectinolytic enzyme from the fungus *Rhizopus oryzae* NBRC 4707. **Microbial Research**, Jena, v. 159, n. 1, p. 83-86, Mar. 2004.

SCHWAN, R.; ROSE, A. H. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 62-67, Feb. 1994.

SEMENOVA, M. V. et al. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. **Biochemistry**, New York, v. 68, n. 5, p. 559-569, Sept. 2003.

SHARMA, A.; GUPTA, M. N. Purification of pectinases by three-phase partitioning. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 23, n. 19, p. 1625-1627, 2001.

SILVA, D. et al. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 318-324, Oct./Dec. 2002.

_____. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase produced by *Penicillium viridicatum* RFC3 in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 42, n. 8, p. 1237-1243, Aug. 2007.

VOVK, I.; SIMONOVSKA, B. Separation of pectin methylesterases and polygalacturonases on monolithic columns. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 849, n. 1/2, p. 337-343, Apr. 2007.

YADAV, S. et al. Purification and characterization of an alkaline pectin lyase from *Aspergillus flavus*. **Process Biochemistry**, London, v. 43, n. 5, p. 547-552, May 2008.

_____. Purification and characterization of pectin lyase secreted by *Penicillium citrinum*. **Biochemistry**, New York, v. 74, n. 7, p. 800-806, July 2009.

CAPÍTULO 4: Características de estabilidade de pectinases obtidas de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries

RESUMO

O estudo objetivou caracterizar as enzimas pectinametilesterase (PME), pectina liase (PL), exo-poligalacturonase (exo-PG) e endopoligalacturonase (endo-PG), obtidas de *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, quanto a sua estabilidade frente ao pH, temperatura e tempo de incubação. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para verificar as condições ótimas de estabilidade enzimática. Os parâmetros avaliados foram tempo de incubação (43 a 107 horas), pH (4,0 a 8,0) e temperatura (30 a 70°C). O pH e a temperatura tiveram efeito negativo sobre a estabilidade de todas as pectinases, em contrapartida, o tempo não influenciou nesta resposta enzimática. A estabilidade das enzimas em estudo foi máxima em pH ácido, entre 3,5 a 5,0, e temperatura em torno de 25 a 35°C. Nestas condições, foi possível reter aproximadamente 95% da atividade enzimática inicial. Apesar do pH influenciar negativamente sobre a estabilidade enzimática, em pH alcalino (8,0) associado a uma temperatura de até 30°C, foi possível manter cerca de 80% da atividade inicial das pectinases. As características de estabilidade de PL, PME, exo-PG e endo-PG, mostraram que estas enzimas podem ser aplicadas em processamentos industriais ácidos e básicos, com temperatura de até 30°C e duração de até 107 horas, sem reduzir seu potencial de ação.

Palavras-chave: Pectinametilesterase. Pectina liase. Exo-poligalacturonase. Endopoligalacturonase. Estabilidade.

ABSTRACT

The study aimed to characterize the enzymes pectinmethylesterase (PME), pectin lyase (PL), exo-polygalacturonase (exo-PG) and endopolygalacturonase (endo-PG), obtained from *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries, as to their stability before pH, temperature and incubation time. The response surface methodology was utilized to verify the optimum conditions of enzyme stability. The parameters evaluated were incubation time (43 to 107 hours), pH (4.0 to 8.0) and temperature (30 to 70°C). Both pH and temperature had negative effect upon the stability of all pectinases, on the other hand, time did not influence this enzyme response. The stability of the enzymes under study was maximal at acidic pH, between 3.5 to 5.0 and temperature around 25 to 35°C. Under these conditions, it was possible to retain about 95% of the initial enzyme activity. In spite of pH influencing negatively the enzyme stability at alkaline pH (8.0) associated too a temperature of up to 30°C, it was possible to keep about 80% of the initial activity of pectinases. The characteristics of stability of PL, PME, exo-PG and endo-PG showed that these enzymes can be applied in acidic and basic industrial processing with temperatures of up to 30°C and duration of up to 107 hours, without reducing their action potential.

Keywords: Pectinmetilesterase. Pectin lyase. Exo-polygalacturonase. Endo-polygalacturonase. Stability.

1 INTRODUÇÃO

As pectinases formam um grupo de enzimas que são capazes de catalisar a degradação de polímeros pécticos presentes na parede celular de plantas (FOGARTY; KELLY 1983). As pectinases são usadas com êxito em uma série de processamentos industriais, com diferentes finalidades. No setor industrial, pectinases ácidas são usadas na extração e clarificação de sucos de frutas (ALKORTA et al., 1998; KASHYAP et al., 2001; ROMBOUTS; PILNIK 1986), enquanto as pectinases alcalinas são aplicadas na degomagem de ramie (CAO; ZHENG; CHEN, 1992), maceração de linho (SHARMA, 1987) e degradação de efluentes provenientes do processamento de frutas (TANABE; KOBAYASHI, 1987).

De acordo com a literatura, fatores como pH, temperatura e tempo podem influenciar, de forma positiva ou não, na estabilidade destas pectinases. Estudos revelam que uma mesma enzima, proveniente de diferentes microrganismos, possui condições ótimas variadas de pH e temperatura os quais geralmente oscilam entre 4,0 a 8,0 e 40°C a 100°C, respectivamente (PEDROLLI et al., 2009).

Ao purificar uma nova enzima com a finalidade de aplicação industrial, é essencial conhecer a sua estabilidade para evitar uma redução no seu potencial de ação. A caracterização de enzimas purificadas é uma importante área de pesquisa, uma vez que se concentra em avaliar as condições ideais para atividade e estabilidade enzimática, além de melhorar a compreensão das propriedades bioquímicas e desempenho catalítico (GUMADI; PANDA, 2003; PEDROLLI; CARMONA, 2010; PEDROLLI et al., 2009).

Nestas condições, o presente estudo objetivou conhecer a estabilidade das enzimas pectinametilsterase (PME), pectina liase (PL), exo-

poligalacturonase (exo-PG) e endopoligalacturonase (endo-PG) frente ao pH, temperatura e tempo de incubação, para verificar as condições ótimas e estabilidade dessas enzimas. Foi utilizado o planejamento experimental com superfície de resposta para determinar o efeito do pH, temperatura e tempo de incubação sobre a estabilidade enzimática.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação do experimento

O estudo de estabilidade das enzimas parcialmente purificadas no capítulo 3 foi conduzido no setor de Microbiologia da Empresa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG/UFLA) e Laboratório de Enzimas do Setor de Microbiologia, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (DBI/UFLA).

2.2 Delineamento experimental para a caracterização da estabilidade das enzimas PME, PL, exo-PG e endo-PG

As enzimas pectinametilesterase (PME), pectina liase (PL), exopoligalacturonase (exo-PG) e endo-poligalacturonase (endo-PG), purificadas no capítulo 3 (itens 2.4 e 2.5), foram caracterizadas quanto a sua estabilidade em diferentes valores de pH (4, 6 e 8), de temperatura (30°C, 50°C e 70°C) e tempo de incubação (43, 75 e 107 minutos). Para manter o pH nos níveis em estudo, foram usadas as soluções tampão acetato de sódio (0,2M) para pH 4, citrato fosfato (0,2M) para pH 6,0 e Tris-HCl (0,2M) para pH 8,0. A temperatura foi mantida nas condições de ensaio através de um banho-maria com controle de temperatura digital (marca FANEM).

Para cada condição experimental, utilizaram-se 10 ml de solução enzimática diluída em solução tampão na mesma proporção (1:1). Terminado o tempo de cada ensaio, as amostras foram retiradas do banho-maria e após atingir a temperatura ambiente foram separadas as alíquotas para medir as atividades enzimáticas específicas. A atividade enzimática foi expressa em atividade

residual (%), tendo como padrão a atividade das pectinases em solução tampão tris-HCl pH 7,5.

O método fatorial completo conhecido como Delineamento Composto Central (DCC), foi utilizado para avaliar a estabilidade das enzimas em diferentes condições. Os resultados foram analisados através de superfície de resposta. Foram estudadas 3 variáveis em 3 níveis. As variáveis independentes avaliadas foram: tempo (X1), pH (X2) e temperatura (X3). Como variável resposta ou dependente foram determinadas as atividades de PME, PL, exo-PG e endo-PG. A Tabela 1 mostra as variáveis reais e codificadas, bem como os seus respectivos níveis.

Tabela 1 Variáveis experimentais com valores reais e codificados

Variáveis		-1	0	+1
Tempo (min)	X1	43	75	107
pH	X2	4,0	6,0	8,0
Temperatura (°C)	X3	30	50	70

O planejamento experimental consistiu de 12 ensaios (Tabela 2), sendo quatro repetições no ponto central. Cada ensaio foi conduzido em triplicata e os resultados apresentados foram as médias obtidas. A análise estatística dos resultados foi realizada através do software Statistica, versão 5.0 (STATISTICA, 1995).

Para complementar o estudo sobre a estabilidade das enzimas também foi realizada uma análise exploratória por PCA dos dados obtidos a partir do

planejamento fatorial. A matriz de dados foi construída usando as variáveis tempo, pH, temperatura e as atividades de PL, PME, Exo-PG e Endo-PG. Os dados passaram por pré-processamento usando autoescalamento. Os cálculos foram executados usando o programa Matlab versão 7.5.

2.3 Determinação das atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas foram determinadas após o tempo de cada ensaio do planejamento experimental. Nestas condições, foram retiradas alíquotas para determinar a atividade enzimática específica das enzimas PME, PL, Exo-PG e Endo-PG.

2.3.1 Pectinametilesterase (PME)

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Schwan e Rose (1994). Uma solução de pectina cítrica a 1% (m/v) foi preparada em NaCl 0,1M, ajustando-se o pH da solução para 7,5 com NaOH 0,5M. Uma alíquota de 3 mL da solução de enzimas e 20 mL da solução de pectina cítrica foram adicionados em Erlenmeyer de 50 mL, sendo a mistura incubada durante 30 minutos, mantendo o pH em 7,5 pela adição de NaOH 0,02M. A atividade de PME foi estimada proporcionalmente ao volume de NaOH gasto na titulação e expressa em microequivalentes de ácido péctico liberado por mL⁻¹ h⁻¹. Uma unidade de pectinametilesterase (U) foi definida como a quantidade de enzima que liberou um microequivalente de ácido péctico por hora de reação.

2.3.2 Pectina liase (PL)

A atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Kashyap et al. (2000). Uma alíquota de 1 ml da solução enzimática foi adicionada a 5mL da solução de pectina (1% m/v). O volume foi ajustado para 10 mL com água destilada. As amostras foram incubadas a 40°C por 2h e em seguida foi adicionado 0,6mL de sulfato de zinco 9% e 0,6 mL de hidróxido de sódio 0,5 M. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm/10 min) e 5 mL do sobrenadante foi adicionado a uma mistura de ácido tiobarbitúrico (3 mL, 0,04 M), HCl (2,5 mL, 0,1 M) e água destilada (0,5 mL). A mistura foi aquecida em banho-maria em ebulição por 30 minutos, resfriada à temperatura ambiente e a absorbância da solução foi lida a 550 nm. Uma unidade de atividade (U) foi dada como a quantidade de enzima que provocou uma alteração na absorbância de 0,01 na condição do ensaio.

2.3.3 Exo-poligalacturonase (Exo-PG)

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Schwan e Rose (1994). Uma curva de calibração para o ácido poligalacturônico foi construída utilizando o método de Miller (1959). Em um tubo de ensaio foi adicionado 1,5 mL da solução de enzimas e 1,0 mL de solução de sal sódico de ácido poligalacturônico a 0,1% em tampão citrato 0,1M pH 5,0. A mistura foi incubada em banho-maria a 40°C por 1 hora e após esse período a reação foi paralisada adicionando-se 1,5 mL de solução de ácido 3,5- dinitrossalicílico (DNS), sendo os tubos mantidos em banho fervente por 5 minutos e, em

seguida, resfriados em banho de gelo. A absorbância da solução foi lida a 575nm.

A atividade (U) de Exo-PG foi expressa na forma de μmol de equivalentes de ácido galacturônico liberados por mL por minuto nas condições do ensaio.

2.3.4 Endo-poligalacturonase (Endo-PG)

A atividade foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Barnby, Morpeth e Pyle (1990). A mistura da reação conteve 5,5 mL de solução de pectina 0,2% em tampão acetato de sódio 0,025M pH 5,0 contendo 1mM de EDTA e 250 μL do extrato enzimático. Após a homogeneização das misturas em agitador de tubo, essas foram incubadas em banho-maria a 50°C por 10 minutos e em seguida a reação foi interrompida colocando-se as amostras em banho de gelo. A leitura foi realizada em viscosímetro de Ostwald tamanho 200, medindo-se o tempo (t) de escoamento das amostras, do branco e da água deionizada, calculando-se a atividade segundo a fórmula representada abaixo.

$$\% \text{ redução da viscosidade} = \frac{t_{\text{Branco}} - t_{\text{Amostra}}}{t_{\text{Branco}} - t_{\text{Água}}} \times 100$$

$$UV / mL = \frac{\frac{\% \text{ redução viscosidade}}{50} \times 4}{10}$$

A unidade de PG foi expressa em unidades relativas viscométricas (URV) por (mg proteína)⁻¹ mL⁻¹. URV é definida como 10³ vezes o tempo em minutos para o decréscimo de 50% da viscosidade relativa da solução.

2.4 Proteínas totais e atividade enzimática específica

Previamente às análises das enzimas citadas anteriormente, foram separadas alíquotas de cada ensaio para determinar o valor de proteínas totais. As concentrações de proteínas foram medidas espectrofotometricamente em 595 nm através do método de Bradford (1976), usando albumina bovina (BSA, Merck, Alemanha) como padrão e reagente de Bradford (Comassie Blue G-250).

As proteínas presentes no extrato enzimático foram quantificadas para determinar a atividade enzimática específica, a qual representa o índice gerado pela relação entre a atividade enzimática (U/mL) e o valor de proteínas totais (mg/mL) da mesma amostra.

$$U \text{ específica} = \frac{U \text{ enzimático (U / mL)}}{\text{proteínas totais (mg / mL)}}$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos mostram que os parâmetros físico-químicos pH, temperatura (T) e tempo (t) podem influenciar na estabilidade de pectinases (GALIOU-PANAYOTOU; KAPANTAI; KALANTZI, 1997; GUMMADI; MANOJ; KUMAR, 2007; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; MARTINS et al., 2007; PEDROLI et al., 2008; SEMENOVA et al., 2003). Para investigar o efeito destes parâmetros sobre a atividade das enzimas PME, PL, Exo-PG e Endo-PG, foi utilizado o delineamento composto central (DCC). A Tabela 2 apresenta a matriz do delineamento e as respostas obtidas (atividades de PL, PME, Exo-PG e Endo-PG) nas condições de ensaio. Para gerar o modelo e construir a superfície de resposta foram utilizados os valores de atividade enzimática residual (AR). Conforme esperado, a estabilidade das enzimas foi influenciada pelos parâmetros físicos estudados.

Tabela 2 Matriz do delineamento e respostas da atividade enzimática

Ensaio	pH	T (°C)	Tempo (min.)	PL (U/mg)	*AR (%)	PME (U/mg)	*AR (%)	Exo-PG (U/mg)	*AR (%)	Endo-PG (U/mg)	*AR (%)
1	4	30	43	17154	98	52	97	13.2	94	461	98
2	8	30	43	13265	76	42	78	10.8	77	412	87
3	4	70	43	11625	66	19	35	3.4	24	104	22
4	8	70	43	5859	33	6.4	12	1.8	13	46	9.8
5	4	30	107	17134	98	52	96	13.1	94	459	97
6	8	30	107	13101	75	40	75	10.6	76	407	86
7	4	70	107	11521	66	18	33	3.2	23	96	20
8	8	70	107	5721	33	4.6	9	1.7	12	38	8
9	6	50	75	11864	68	43	80	9.9	71	317	67
10	6	50	75	11542	66	42	78	10	71	306	65
11	6	50	75	11128	64	42	79	9.7	69	317	67
12	6	50	75	11086	63	44	81	9.5	68	319	68

*AR é equivalente a atividade enzimática residual. A atividade enzimática inicial foi 17483 U/mg (PL), 53.7 U/mg (PME), 14 U/mg (exo-PG) e 471 U/mg (endo-PG).

Através dos resultados experimentais obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão e ajustar um modelo linear que relaciona a atividade enzimática com os parâmetros estudados (pH, temperatura e tempo). Para todos os casos, um modelo linear foi o que melhor descreveu a relação entre as atividades enzimáticas e os parâmetros de estabilidade. A Tabela 3 mostra os modelos obtidos e os coeficientes de determinação (R^2) para as enzimas PL, PME, Exo-PG e Endo-PG. A porcentagem de variância explicada (R^2) pelos modelos foi satisfatória para todas as respostas do estudo, indicando boa concordância entre os valores de atividades enzimáticas experimentais e aqueles preditos pelos modelos. A partir destes modelos lineares foram construídas as curvas de contorno para a visualização das condições de estabilidades das enzimas PL, PME, Exo-PG e Endo-PG, sobre diferentes condições de pH, temperatura (T) e tempo (t).

Tabela 3 Modelos preditos para atividade enzimática

Enzima	Modelo predito	R^2
PL	$PL = 135.8 - 3.5 \text{ pH} - 0.5 T - 0.002 t - 0.07 \text{ pH} \cdot T - 0.002 \text{ pH} \cdot t + 0.0002 T \cdot t$	0,99
PME	$PME = 178.3 - 5.4 \text{ pH} - 1.6 T - 0.03 t$	0,84
Exo-PG	$\text{Exo-PG} = 163.9 - 3.56 \text{ pH} - 1.7 T - 0.01t$	0,91
Endo-PG	$\text{Endo-PG} = 173.2 - 2.9 \text{ pH} - 1.9T - 0.02 t$	0,96

O diagrama de Pareto (Figura 1A) foi usado para avaliar a significância e o tipo dos efeitos (sinérgico ou antagônico) sobre a atividade enzimática relativa. De acordo com os dados da Figura 1A, as variáveis temperatura, pH e também a interação entre elas, foram significativas ($p > 0,05$) na estabilidade da enzima pectina liase (PL). O efeito principal destas variáveis foi negativo, portanto, segundo a curva de contorno (Figura 1B), a estabilidade da enzima PL foi máxima em pH ácido, entre 3,5 a 5,0 e temperatura mais baixa, em torno de 25 a 40°C. Nesta faixa ótima de pH e temperatura, foi possível reter aproximadamente 98% da atividade enzimática inicial, o que segundo a literatura pode ser considerado como alta estabilidade enzimática (PEDROLI et al., 2009). A enzima perdeu sua estabilidade quando incubada em pH superior a 8,0 e temperatura acima de 50°C. Nestas condições a enzima preservou apenas 50% de sua atividade enzimática inicial. Também foi possível obter níveis satisfatórios de atividade enzimática residual (próximo a 70%) em temperaturas mais elevadas (40 a 65°C), desde que as condições de pH fossem mais ácidas (entre 3,5 e 4,0). Quando a PL desse estudo foi incubada em pH alcalino (8,0), e temperatura não superior a 30 °C houve retenção de 80% de sua atividade inicial. Estas interpretações comprovam o efeito de interação antagônico entre o pH e a temperatura para a PL estudada.

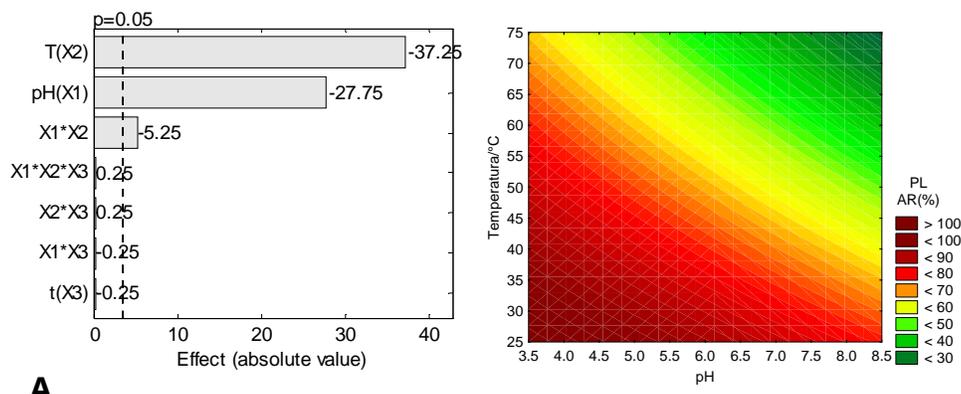


Figura 1 Diagrama de Pareto (A) com efeito do pH (X1), temperatura (X2), tempo (X3) e suas interações sobre a atividade residual de PL. Curva de Contorno (B) em função da interação entre as variáveis temperatura e pH sobre a atividade residual de PL

Assim como ocorreu para a enzima PL, as variáveis que influenciaram ($p \leq 0,05$) na estabilidade da enzima PME foram a temperatura e o pH. A figura 2A mostra que estas variáveis tiveram um efeito negativo sobre a atividade enzimática residual. De acordo com a curva de contorno (figura 2B), a enzima PME apresentou alta estabilidade em pH ácido (entre 3,5 e 5,0) e temperatura de até 35°C, retendo mais de 95% de sua atividade inicial. A enzima perdeu estabilidade ($AR < 50\%$) quando incubada em temperatura acima de 50°C. Apesar de o pH apresentar um efeito negativo sobre a atividade enzimática residual, foi possível manter 80% da atividade de PME em pH alcalino (8,0), desde que este pH estivesse associado a uma temperatura de até 30 °C.

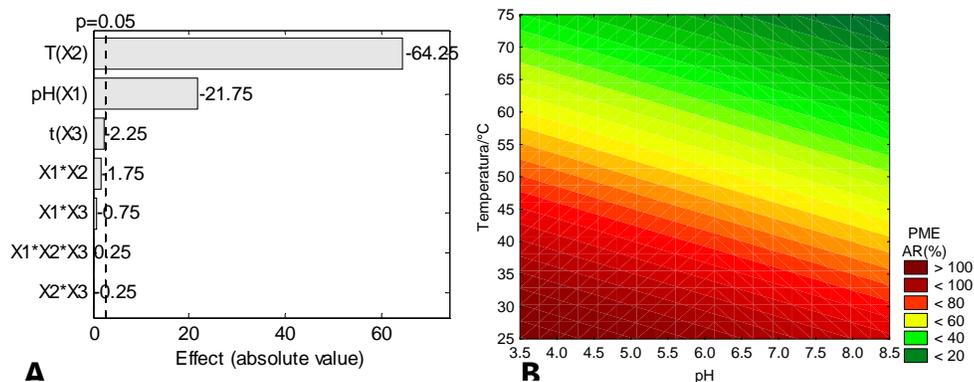


Figura 2 Diagrama de Pareto (A) com efeito do pH (X1), temperatura (X2), tempo (X3) e suas interações sobre a atividade residual de PME. Curva de Contorno (B) em função da interação entre as variáveis temperatura e pH sobre a atividade residual de PME

A estabilidade das enzimas Exo-PG e Endo-PG também foi influenciada negativamente pelas variáveis temperatura e pH, conforme ilustra as figuras 3A e 4A. As curvas de contorno (figura 3B e 4B) mostram que as enzimas Exo-PG e Endo-PG possuem alta estabilidade, em pH ácido (entre 3,5 a 5,0) e temperatura baixa (25 a 35°C), mantendo aproximadamente 95% de sua atividade enzimática inicial. Um aumento adicional nos valores de pH e temperatura, resultou em uma queda na atividade enzimática residual, perdendo cerca de 50% de sua atividade inicial em temperatura acima de 55°C. Apesar de o pH apresentar um efeito negativo sobre a atividade enzimática residual de Exo e Endo-PG, em temperatura inferior à 30 °C e pH alcalino (8,0), foi possível manter cerca de 80% da atividade enzimática inicial.

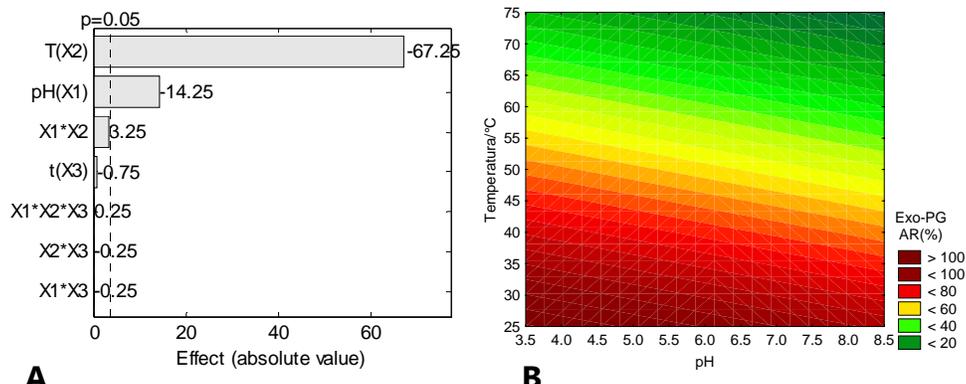


Figura 3 Diagrama de Pareto (A) com efeito do pH (X1), temperatura (X2), tempo (X3) e suas interações sobre a atividade residual de exo-PG. Curva de Contorno (B) em função da interação entre as variáveis temperatura e pH sobre a atividade de exo-PG

Ao contrário do que é relatado na literatura, nas condições do experimento, considerando-se o tempo entre 43 a 107 horas, as enzimas em estudo apresentaram atividade satisfatória em todos os tempos avaliados, portanto, estas pectinases podem ser aplicadas em processamentos industriais com duração de até 107 horas, sem perder o seu potencial de ação, mantendo atividade residual em torno de 98% (PL), 96% (PME), 94% (Exo-PG) e 97% (Endo-PG) quando incubadas em pH 4 à temperatura de 30 °C (Tabela 2).

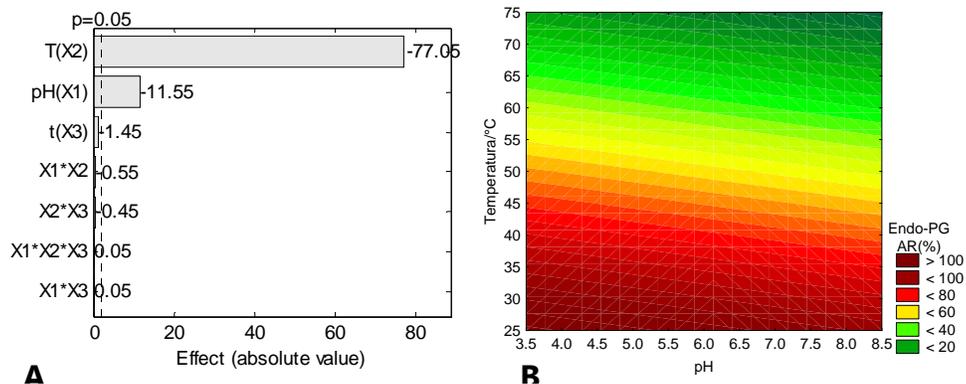


Figura 4 Diagrama de Pareto (A) com efeito do pH (X1), temperatura (X2), tempo (X3) e suas interações sobre a atividade residual de endo-PG. Curva de Contorno (B) em função da interação entre as variáveis temperatura e pH sobre a atividade residual de endo-PG

Uma discussão mais ampla sobre o efeito de todos os parâmetros físico-químicos estudados na estabilidade das enzimas PL, PME, Exo e Endo-PG, foi feita através da análise de componentes principais (PCA). Esse método foi usado com o objetivo de se ter uma visão global da influência do pH, temperatura e tempo sobre a estabilidade de todas as enzimas. Somente o gráfico de pesos foi avaliado (Figura 5), uma vez que o objetivo dessa análise foi estudar as relações entre as condições de incubação das enzimas e a estabilidade enzimática.

A primeira componente principal (PC1), que explica maior quantidade de variância (67,07%), indica que as enzimas PL, PME, Endo e Exo-PG apresentaram características de estabilidade semelhantes, caracterizadas pela maior estabilidade nos níveis inferiores de pH e temperatura. Os dados do PCA corroboram os dados do planejamento fatorial mostrando que o tempo não influenciou na estabilidade das enzimas em estudo, tendo as enzimas mantendo atividade residual acima de 90% durante períodos de até 107 horas.

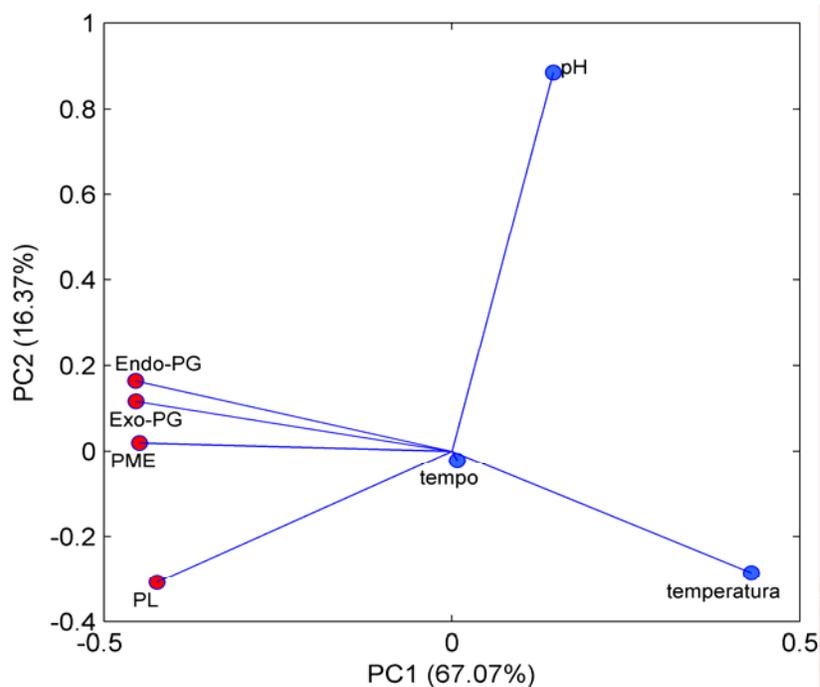


Figura 5 Pesos da PCA para as variáveis tempo, pH, temperatura e atividade residual das enzimas PL, PME, Exo-PG e Endo-PG

As condições de estabilidade, das pectinases em estudo, corroboram os dados de alguns estudos, onde tem sido relatado que as pectinases fúngicas possuem maior estabilidade em condições ácidas (GUMANDI; KUMAR, 2006; GUMMADI; MANOJ; KUMAR, 2007; MALVESSI; SILVEIRA, 2004; MARTINS et al., 2007; PERDOLLI et al., 2008) e são sensíveis à desnaturação em temperaturas acima de 50°C (GALIOTOU-PANAYOTOU; KAPANTAI; KALANTZI, 1997; KAUR; KUMAR; SATYNARAYANA, 2004; MALVESSI; SILVEIRA, 2004; PEDROLI et al., 2008; SEMENOVA et al., 2003; SILVA et

al., 2002; TENG-GUO et al., 2002). Além disso, a maioria das pectinases possuem intervalo ótimo de pH entre 3,5-5,5 e faixa de temperatura ideal entre 30-50°C (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

Os resultados do presente estudo merecem destaque, pois apesar da estabilidade das enzimas PL, PME, exo-PG e endo-PG ser maior em condições ácidas, foi possível manter 80% de sua atividade enzimática inicial em pH alcalino (8,0). Além disso, essas enzimas são estáveis em um intervalo de tempo maior (até 107 horas) que o relatado por outros autores (PEDROLLI et al., 2008; SEMENOVA et al., 2003). Portanto, as pectinases caracterizadas neste estudo, poderão ser aplicadas em uma grande variedade de processos industriais, mesmo aqueles mais demorados, sem perda significativa de sua atividade.

4 CONCLUSÃO

Apesar do pH influenciar negativamente na estabilidade enzimática, foi possível manter cerca de 80% da atividade inicial de PL, PME, Exo-PG e Endo-PG em condições de pH alcalino (8.0), associada a uma temperatura de até 30°C.

A estabilidade das enzimas em estudo foi máxima em pH ácido, entre 3,5 a 5,0, e temperatura em torno de 25 a 35°C. Nesta faixa foi possível reter aproximadamente 95% da atividade enzimática inicial.

O tempo não teve um efeito significativo sobre a estabilidade destas enzimas, portanto, estas pectinases podem ser aplicadas em processamentos industriais com duração de até 107 horas, sem perder o seu potencial de ação.

As características de estabilidade de PL, PME, exo-PG e endo-PG, mostraram que estas enzimas podem ser aplicadas em processamentos industriais ácidos e básicos, com temperatura de até 30°C e duração de até 107 horas, sem reduzir seu potencial de ação.

5 PERSPECTIVAS

As enzimas PL, PME, exo-PG e endo-PG, obtidas de *Cladosporium cladosporioide* (Fres.) de Vries, poderão ser utilizadas pelo setor industrial, pois apresentaram potencial de ação significativo em condições ácidas e básicas.

É possível disponibilizar para as indústrias pectinases com elevado potencial de ação e com baixo custo.

REFERÊNCIAS

ALKORTA, I. et al. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 33, n. 1, p. 21-28, Jan. 1998.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analysis Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAO, J.; ZHENG, L.; CHEN, S. Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 14, n. 12, p. 1013-1017, Dec. 1992.

FOGARTY, M. V.; KELLY, C. T. Pectic enzymes. In: FOGARTY, M. W. (Ed.). **Microbial enzymes and biotechnology**. London: Applied Science, 1983. p. 131-182.

GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KAPANTAI, M.; KALANTZI, O. Growth conditions of *Aspergillus* sp. ATHUM-3482 for polygalacturonase production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 47, n. 4, p. 425-429, Apr. 1997.

GUMANDI, S. N.; KUMAR, D. S. Enhanced production of pectin lyase and pectate lyase by *Debaryomyces nepalensis* in submerged fermentation by statistical methods. **American Journal of Food Technology**, New York, v. 1, n. 1, p. 19-33, 2006.

GUMMADI, S. N.; MANOJ, N.; KUMAR, D. S. Structural and biochemical properties of pectinases. In: _____. **Industrial enzymes**. New York: Elsevier, 2007. p. 19-115.

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.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, Sept. 2005.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 77, n. 2, p. 215-227, Feb. 2001.

_____. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp DT7. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 277-282, 2000.

KAUR, G.; KUMAR, S.; SATYNARAYANA, T. Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Aipinis. **Bioresource Technology**, Essex, v. 94, n. 3, p. 239-243, Sept. 2004.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. da. 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. 2004.

_____. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 91, n. 3, p. 291-299, 2007.

MILLER, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426-428, 1959.

PEDROLI, D. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 37, n. 6, p. 567-573, June 2010.

PEDROLI, D. B. et al. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, London, v. 3, n. 1, p. 9-18, Feb. 2009.

_____. Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 144, n. 2, p. 191-200, Apr. 2008.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectinases and other cell-wall degrading enzymes of industrial importance. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 2, n. 1, p. 79-89, 1986.

SCHWAN, R.; ROSE, A. H. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 62-67, Feb. 1994.

SEMENOVA, M. V. et al. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. **Biochemistry**, New York, v. 68, n. 5, p. 559-569, Sept. 2003.

SHARMA, H. S. S. Enzymatic degradation of residual non-cellulosic polysaccharides present on dew retted flax fibers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 26, n. 4, p. 358-362, Apr. 1987.

SILVA, D. et al. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agro-industrial by-products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 318-324, Oct./Dec. 2002.

STATISTICA. **Statistica 5.1 software**. Tucks, 1995. Software.

TANABE, H.; KOBAYASHI, Y. Plant tissue maceration caused by pectinolytic enzymes from *Erwinia* spp. under alkaline conditions. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 51, n. 10, p. 2845-2846, Oct. 1987.

TENG-GUO, C. et al. Purification and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Aspergillus niger*. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 26, n. 3, p. 253-265, Mar. 2002.