MELHORAMENTO GENÉTICO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES PECTINOLÍTICOS DE *Penicillium chrysogenum*

Francisco Alberto Pelissari
Farmacêutico

Orientadora: Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz” da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Agronomia. Área
de Concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro – 2000

ERRATA

Página 25 – Item 3.10, 4ª linha, onde se lê: “placa de Petri estéril”, leia-se “placa de Petri esterilizada”.

Página 28 – Item 3.15 – Atividade específica de PG foi definida como μ Moles de ácido galacturônico liberados por mL de filtrado, por minuto, por mg de micélio, na temperatura de reação.

- Item 3.16 - Atividade específica de PL foi definida como nMoles de produto insaturado liberados por mL de filtrado, por minuto, por mg de micélio, na temperatura de reação.

Página 30 – Item 4.3, 10ª linha, onde se lê: “pectinolíticas extracelulares.”, leia-se: “pectinolíticas extracelulares, através do índice enzimático (IE).”

Página 32 – Item 4.4.1, 6ª linha, onde se lê: “pectinases. Em meio de...”, leia-se: “pectinases em meio de...”

Página 33 – 9ª linha, onde se lê: “...a de PL.”, leia-se: “...a de PL (Tabela 02).”
11ª linha, onde se lê: “M 266”, leia-se: “M 226”.

Página 46 – 4ª linha, onde se lê: “Figura 2A”, leia-se: “Figura 12A”. 9ª, 12ª e 13ª linhas, onde se lê: “Figura 2C”, leia-se: “Figura 12C”.

Página 47 – 8ª linha, onde se lê: “Figura 2B”, leia-se: “Figura 12B”.

Página 55 – 20ª linha, onde se lê: “4626 apresentou-se...”, leia-se: “4626 que apresentou-se...”

Página 59 – 4ª linha, onde se lê: “...mas não no 2º para o 3º”, leia-se: “mas não no 2º”.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Pelissari, Francisco Alberto

Melhoramento genético e caracterização de mutantes pectinolíticos de *Penicillium chrysogenum* / Francisco Alberto Pelissari. - - Piracicaba, 2000.
68 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000.
Bibliografia.

1. Fungo pectinolítico 2. Melhoramento genético 3. Mutação induzida 4. Pectina
liase 5. Pectinase 6. Poligalacturonase microbiana I. Título

CDD 574.1925

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À Deus, razão de toda existência;

A meus pais, Maria e Antonio (*in memoriam*),
pela minha existência;

À família;

À Adriana, amiga, companheira, e a nosso filho (a), agora a caminho.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

- À Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, pela orientação e confiança.
- À Profa. Dra. Sílvia Maria Guerra Molina, pelo apoio, colaboração e incentivo constante, e acima de tudo pela valiosa amizade.
- Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, pelo apoio e amizade.
- Aos Profs. Drs. Daison Olzany Silva e Jorge L. C. Coelho da Universidade Federal de Viçosa, pelas sugestões.
- Ao Prof. Dr. Flavio Cesar A. Tavares, pelo apoio e amizade.
- Aos estagiários do laboratório, Luciana Ferraz, Paulo Mattus, Lígia Medeiros, Adriana Leites, Cássio Mitsuiki e Maurício Buzzeto, pela colaboração.
- Aos bibliotecários da Esalq, pelo apoio.
- Aos técnicos de laboratório, José Antonio e Marcos Gorga, pela colaboração.
- A Gilma Sturion, pela oportunidade e amizade.
- Aos amigos Luiz Humberto, Keila Maria e Ana Maria, pelo apoio, colaboração, incentivo constante, e valiosa amizade.
- Aos Profs. Drs. Luiz Carlos Basso, Luiz Gonzaga do Prado Filho, Walter Maccheroni Jr., pela sugestões.
- À CAPES pelo auxílio financeiro.
- À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1- Introdução	3
2.2- Substâncias Pécicas	4
2.3- Enzimas Pectinolíticas	5
3- MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1- Linhagens Utilizadas	14
3.2- Manutenção das Culturas em Estoque.....	14
3.3- Meios de Cultura	15
3.3.1- Meio Mineral para Microrganismos Celulolíticos.....	15
3.3.2- Meio Completo	15
3.3.3- Meio Mineral Tampão Forte (MMTF)	16
3.3.4- Meio Mineral Tampão fraco (MMTf)	16
3.4- Soluções e Reagentes	17
3.4.1- Substrato para Pectina Liase (PL)	17
3.4.2- Substrato para Poligalacturonase (PG)	17
3.4.3- Reagente Ácido dinitrosalicílico (DNS)	18
3.4.4- Solução Tampão de Sörensen 100 mM pH 6.8	18
3.4.5- Solução Tampão Acetato de Sódio 100 mM pH 4.8	18

3.4.6- Solução Tampão Acetato de Sódio 100 mM pH 4.4	19
3.4.7- Solução Tampão Fosfato de Potássio 0,05 M pH 7.0.....	19
3.4.8- Solução Tampão Fosfato de Sódio 0,2 M pH 7.0.....	19
3.4.9- Solução de Nitrito de Sódio	20
3.4.10- Tween 80	20
3.4.11- Solução Salina (Cloreto de Sódio) 0,85%	20
3.4.12- Solução de Cloreto de Sódio 2,5 M.....	20
3.4.13- Solução de Vitaminas	21
3.4.14- Solução de Brometo hexadeciltrimetilamônio 1%.....	21
3.4.15- Solução de Albumina 50%	21
3.4.16- Solução de HCl 0,1 N	22
3.4.17- Solução de HCl 0,01 N	22
3.4.18- Solução de Giemsa 1%	22
3.4.19- Solução de NaOH 2 N	22
3.5- Obtenção de Esporos	23
3.6- Suspensão de Esporos.....	23
3.7- Concentração de Inóculo	23
3.8- Avaliação e Seleção das Linhagens em Meio Sólido.....	24
3.9- Técnica Citológica.....	24
3.10- Estabelecimento da Curva de Sobrevivência à Luz Ultravioleta.....	25
3.11- Estabelecimento da Curva de Sobrevivência ao Ácido Nitroso	26
3.12- Isolamento de Mutantes	26
3.13- Condições de Cultivo em Meio Líquido	27
3.14- Determinação da Massa Micelial.....	27
3.15- Determinação da Atividade da Poligalacturonase	27
3.16- Determinação da Atividade da Pectina Liase	28

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1- Caracterização Citológica da Linhagem IFO 4626 de <i>Penicillium chrysogenum</i>	29
4.2- Curva de Sobrevivência à Luz Ultravioleta.....	30
4.3- Curva de Sobrevivência ao Ácido Nitroso	30
4.4- Avaliação das Atividades Enzimáticas das Linhagens.....	32
4.4.1- Avaliação de Pectinases em Meio de Cultura Sólido	32
4.4.2- Avaliação da Atividade Celulolítica em Meio Sólido	42
4.4.3- Avaliação em Cultura Líquida	43
4.4.3.1- Avaliação da Produção de Pectina Liase (PL) através da Cinética de Crescimento	43
4.4.3.2- Avaliação da Produção de Poligalacturonase (PG) através da Cinética de Crescimento	51
5- CONCLUSÃO	61
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1- Efeitos de meio e linhagem quanto à atividade de pectinases – Análise de Variância	32
Tabela 2- Teste de Tukey para médias de índice enzimático referente à atividade de pectinases em meio sólido.....	35
Tabela 3- Teste de Tukey para médias de linhagens cultivadas em MMTF	37
Tabela 4- Teste de Tukey para médias de linhagens cultivadas em MMTf	38
Tabela 5- Efeitos de meio, linhagem e tempo de tratamento sobre à atividade de PL–Análise de Variância	43
Tabela 6- Teste de Tukey para médias de atividade de PL e atividade específica de PL por meio, tempo de cultivo e linhagem.....	45
Tabela 7- Teste de Tukey para médias de atividade de PL e atividade específica de PL por linhagem e meio de cultivo ..	46
Tabela 8- Teste de Tukey para médias de atividade de PL e atividade específica de PL por linhagem, por tempo e meio de cultivo	48
Tabela 9- Efeito do tempo de cultivo em MMTF e MMTf sobre atividade de PL e atividade específica de PL em linhagens de <i>P. chrysogenum</i> – Regressão polinomial	49
Tabela 10- Efeitos de meio, linhagem e tempo de tratamento sobre à atividade de PG e atividade específica de PG – Análise de Variância	51

Tabela11-	Teste de Tukey para médias de atividade de PG e atividade específica de PG por meio, tempo de cultivo e linhagem.....	53
Tabela12-	Teste de Tukey para médias de atividade de PG e atividade específica de PG por linhagem e meio de cultivo.....	54
Tabela13-	Teste de Tukey para médias de atividade de PG e atividade específica de PG por linhagem, por tempo e meio de cultivo	57
Tabela14-	Efeito de linhagem e meio de cultivo sobre à atividade de PG e atividade específica de PG em linhagens de <i>P. chrysogenum</i> - Regressão polinomial	58

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1- Fragmento de uma molécula de pectina	5
Figura 2- Fragmento de uma molécula de pectina e o ponto de ataque de uma pectinesterase	7
Figura 3- Esquema de clivagem das ligações glicosídicas α -1,4 pela enzima poligalacturonase.....	8
Figura 4- Fragmento de uma molécula de pectina e o ponto de Ataque de uma pectina liase	9
Figura 5- Núcleos de conídios da IFO 4626 de <i>P. chrysogenum</i> , corados com Giemsa	29
Figura 6- Curva de sobrevivência da linhagem IFO 4626 de <i>P.</i> <i>chrysogenum</i> à luz ultravioleta.....	31
Figura 7- Curva de sobrevivência da linhagem IFO 4626 de <i>P.</i> <i>chrysogenum</i> ao ácido nitroso.....	31
Figura 8- Aspectos morfológicos das linhagens IFO 4626, M85 e L85 cultivadas em meio completo	39
Figura 9- (A) Aspectos morfológicos das linhagens IFO 4626, M 85 e L 85, cultivadas em MMTF pH 7.2 e (B) respectivos halos de degradação da pectina.....	40
Figura 10- (A) Aspectos morfológicos das linhagens IFO 4626, M 85 e L 85, cultivadas em MMTf pH 6.3 e (B) respectivos halos de degradação da pectina.....	41
Figura 11- (A) Linhagem QM 9414 de <i>Trichoderma reesei</i> , cultivada em meio para celulolíticos e (B) Linhagens IFO 4626, M 85 e L 85, cultivadas em meio para celulolíticos.....	42

Figura 12- Cinética da atividade de PL (A e C) e atividade específica de PL (B e D) em meio MMTF (A e) e MMTf (C e D)	50
Figura 13- Cinética da atividade de PG (A e C) e atividade específica de PG (B e D) em meio MMTF (A e B) e MMTf (C e D).....	60

MELHORAMENTO GENÉTICO E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES PECTINOLÍTICOS DE *Penicillium chrysogenum*

Autor: Francisco Alberto Pelissari

Orientadora: Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo elevar através de mutações a produção de enzimas pectinolíticas e manter em níveis insignificantes a de celulasas na linhagem IFO 4626 de *Penicillium chrysogenum*.

No 1º ciclo de mutação-seleção utilizando radiação ultravioleta foram obtidos mutantes que, selecionados em meio de cultura sólido apresentaram produção de pectinases superior à linhagem original, foram isolados 390 mutantes e destes, os 38 superiores foram reavaliados destacando-se a linhagem M 85. Na avaliação em meio de cultura líquido, a M 85 quando comparada à original apresentou elevação da atividade específica de PL em torno de 40% cultivada em MMTF e de 20% na atividade específica de PG, no mesmo meio. Aumento menos expressivo de atividade específica de PL foi encontrado quando cultivou-se a M 85 em MMTf, 10%, enquanto que para a atividade específica de PG no mesmo meio não houve mudança significativa.

Dando continuidade ao processo de melhoramento, a M 85 foi submetida a um novo ciclo de mutação-seleção através do ácido nitroso. Foram isolados

através de seleção em meio de cultura sólido, 410 novos mutantes. Destes, 8 se destacaram, sendo superior entre eles, a linhagem L 85. Na avaliação em meio de cultura líquido, no MMTF, a L 85 quando comparada à M 85 e à IFO 4626 teve aumentada a atividade específica de PL elevada em torno de 100% e 200% respectivamente; para a atividade específica de PG, o aumento foi de 15% e 40% com relação à M 85 e IFO 4626, respectivamente. A atividade específica de PL da linhagem L 85 cultivada no meio MMTf apresentou aumento em torno de 30% e 40% quando comparada à M 85 e IFO 4626, respectivamente. Com relação à atividade específica de PG da L 85 cultivada no meio MMTf, não houve alteração significativa quando comparada com as linhagens IFO 4626 e M 85 no referido meio.

**GENETIC BREEDING AND CHARACTERIZATION OF *Penicillium*
chrysogenum PECTINOLITIC MUTANTS**

Author: Francisco Alberto Pelissari

Adviser: Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

Abstract

The present work had the objective to increase the pectinolytic enzyme production by mutation, maintaining low the cellulase production of the IFO 4626 *Penicillium chrysogenum*.strain.

During the first cycle of mutation, using U.V. radiation, mutants with higher pectinases rate than the original strain were obtained and selected in a solid medium. From 390 colonies, 38 strains show higher levels of pectinases, among them, the M85 strain was chosen. In liquid medium, the M85 show specific activity for PL (pectin lyase), around 40%, and 20% of PG (polygalacturonase) specific activity cultivated in MMTF medium, compared to the original strain. Less expressive PL specific activity could be seen on MMTf medium, around 10% and no significant difference was observed for PG specific activity.

To improve the genetic breeding, the M85 strain was submitted to a new mutation cycle, with nitric acid. 410 new mutants could be isolated, and among eight good selected strains, the L85 was chosen.

Compared to M85 and to the original strain (IFO 4626) the L85 show PL specific activity, in the MMTF liquid medium MMTF, L 85 strain increased 100% and 200% respectively, and for PG specific activity, around 15% and 40%, respectively. For the MMTf medium, the specific activity gain from L85, compared to M85 and IFO 4626 was 30% and 40% for PL, respectively and no significant differences could be observed for PG specific activity, compared to both strains, on MMTf medium.

1- INTRODUÇÃO

Enzimas microbianas extracelulares são uma importante classe de proteínas responsáveis pela reciclagem de matérias orgânicas insolúveis na natureza. Uma vez sintetizada por uma célula, uma enzima poderá atuar independentemente da mesma, se condições apropriadas forem mantidas.

Há milênios, o homem vem se utilizando da ação catalítica das enzimas, sejam elas de origem animal, vegetal ou microbiana, na preparação de bebidas alcoólicas, panificação, fabricação de queijos e preparação de fibras vegetais, entre outros.

A degomagem enzimática de fibras têxteis envolve o desenvolvimento de tecnologia de alto valor comercial. Tal processamento quando aplicado a fibras celulósicas amplia sua aceitação junto ao mercado consumidor por atuar, com vantagem em relação aos processos químicos usuais, sobre o conjunto de suas características como produto têxtil, tais como toque, resiliência e brilho. Tais atributos elevam expressivamente seu valor comercial, além de controlar possíveis problemas ambientais devidos ao emprego da degomagem química convencional no processamento de fibras celulósicas.

Por razões como estas, o grande avanço alcançado pela Biotecnologia em Enzimologia, tem despertado crescente interesse por parte de vários segmentos industriais, tornando esse setor um dos principais na Biotecnologia.

Fibras vegetais encontram-se disponíveis em volumes consideráveis em países em desenvolvimento, seja como produtos agrícolas (sisal, rami, abacá e juta) ou seus resíduos (fibra de pseudocaule de bananeiras frutíferas). O uso dessas fibras vem sendo limitado considerando-se o potencial de exploração

em níveis economicamente viáveis sendo necessários para tanto, avanços tecnológicos nos métodos de processamento (JARMAN et al., 1977; BENATTI, 1985).

As características têxteis da fibra da bananeira, presentes mais especificamente no Abacá (*Musa textilis*), mas também expressivas em espécies de bananeiras com frutos comercializados, são pouco exploradas no Brasil e apenas em atividades artesanais, ocorrendo por meio de processamento rudimentar das fibras. Pretendendo colaborar para viabilizar o aprimoramento do nível tecnológico, obteve-se no presente trabalho, enzimas pectinolíticas adequadas à degomagem de fibras têxteis de origem celulósica.

Tais enzimas, as pectinases, têm aplicações mais difundidas na indústria de alimentos, como as de sucos e frutas e vinhos. Entretanto, graças a vantagens técnicas e econômicas, sua aplicação em produtos têxteis já se estabeleceu no mercado internacional (ROSEMBERG, 1975) e estudos vêm sendo realizados, buscando-se avaliar e aprimorar as tecnologias disponíveis para a maceração enzimática de fibras (para o linho, por exemplo: SHARMA, 1987; SHARMA et al., 1989).

No presente trabalho, para a obtenção de enzimas utilizadas na degomagem de fibras têxteis conduziu-se o melhoramento genético da linhagem IFO 4626 de *Penicillium chrysogenum* com o objetivo de elevar sua produção de pectinases, mantendo em níveis insignificantes a atividade de celulases. Através de ciclos de mutação-seleção utilizando-se radiação Ultravioleta e Ácido Nitroso, obteve-se mutantes superiores às linhagens originais quanto à produção de pectinases.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Introdução

Na natureza são encontrados fungos que produzem quantidade efetivas de pectinases, sendo que algumas espécies apresentam uma baixa produção de celulasas. Para que a aplicação de enzimas pectinolíticas na indústria têxtil seja economicamente viável, é importante a seleção e o melhoramento de linhagens superprodutoras de pectinases, às quais se associem níveis insignificantes de atividade celulolítica. O melhoramento genético de espécies fúngicas, visando tais características, pode ser conseguido por meio da mutagênese física ou química. Portanto se faz necessário o uso de técnicas seletivas para a obtenção das linhagens que apresentam maior interesse.

A principal razão para utilizar microrganismos como fontes potenciais de enzimas é a facilidade com que os níveis enzimáticos podem ser aumentados por mutações genéticas ou alterações nas condições de cultivo. Como qualquer organismo vivo, as espécies microbianas apresentam variabilidade genética e, como ocorre há muitos séculos com as plantas superiores e com os animais, também os microrganismos podem ser submetidos a processos de melhoramento que os tornem mais aptos para realizar certas funções (AZEVEDO, 1986). Dentro deste contexto, o processo de mutação-seleção tem sido aplicado com notável sucesso no melhoramento de microrganismos para caracteres de importância industrial (SOLLER, 1980).

Graças às vantagens técnicas e econômicas, sua aplicação em produtos têxteis já se estabeleceu no mercado internacional. Entretanto o sucesso desse processo em escala industrial depende da utilização de linhagens de microrganismos com alta capacidade de produção para reduzir os custos do processo. As indústrias que se utilizam de linhagens com tal perfil tratam-nas como segredo industrial, de modo que torna-se indispensável proceder à obtenção de linhagens melhoradas.

2.2 - Substâncias Pécicas

As substâncias pécicas são polissacarídeos estruturais da lamela média e parede celular primária de plantas superiores (TALMADGE et al., 1973; WHITAKER, 1984). Estas substâncias são constituídas por unidades de ácido galacturônico polimerizadas por meio de ligações glicosídicas α -(1-4), interrompidas por radicais raminosídicos inseridos por ligações α -(1-2), (REXOVÁ-BENKOVÁ & MARKOVIC, 1976). Açúcares neutros como D-galactose, L-arabinose, D-xilose e L-fucose também podem estar presentes na estrutura da pectina formando cadeias laterais (REXOVÁ-BENKOVÁ & MARCOVIC, 1976). O grau de esterificação da cadeia de pectina e os grupos substituintes são as características mais importantes da sua estrutura, as quais determinam a heterogeneidade dos compostos pécicos (WEINSCHUTZ et al., 1993).

De acordo com GARNIER et al. (1994), pectinas são industrialmente extraídas de plantas e usadas como agentes geleificantes em diferentes preparações alimentares, dependendo do seu conteúdo de grupos metoxil.

Para a obtenção de produto industrial desejado, muitas vezes torna-se fundamental a degradação das substâncias pécicas, sendo estas o substrato natural das enzimas pectinolíticas. Pectinas modificadas podem ser obtidas, por

meio de reações que envolvem a produção de sais, éteres, ésteres ou pela variação do grau de esterificação (GARNIER et al., 1994).

Segundo ESKIN et al. (1971), além da pectina, existem mais três tipos de substâncias pécticas: ácidos pécticos, ácidos pectínicos e protopectinas.

Ácido péctico: também denominado de ácido poligalacturônico, é a substância péctica totalmente livre de metil éster, com grupos carboxílicos livres, de alto peso molecular, solúvel em água (WHITAKER, 1972; ROMBOUTS & PILNIK, 1980; FOGART & KELLY, 1983).

Ácido pectínico: é um polímero de ácido galacturônico, contendo poucos grupos de metil ésteres (CHESSON, 1980).

Protopectina : substância péctica encontrada nos vegetais, insolúvel em água e que por meio de quebra pode ser convertida em ácido pectínico ou pectina, de acordo com o tratamento aplicado (WHITAKER, 1972).

Figura 01- Fragmento de uma molécula de pectina.

2.3 - Enzimas Pectinolíticas

Os sistemas enzimáticos capazes de degradar os polissacarídeos pécticos são largamente distribuídos na natureza e apresentam variados

mecanismos de ação, o que é esperado devido à larga ocorrência desses polissacarídeos no reino vegetal.

As enzimas pécticas são produzidas em grande quantidade, por muitos microrganismos associados a plantas (ROMBOUTS & PILNIK, 1980) e representam uma classe de enzimas envolvidas na degradação de substâncias pécticas. Estas enzimas são, geralmente, reconhecidas como agentes responsáveis pela maceração dos tecidos de plantas, uma vez que os polímeros pécticos, aí presentes, são substratos para a ação das mesmas (STARR & CHATTERJEE, 1972; CHAMIER, 1985; COLLMER & KEEN, 1986).

As enzimas que degradam os compostos pécticos são denominadas pectinolíticas e podem ser classificadas em três grupos: protopectinases, pectinesterases e despolimerases (SAKAI et al., 1993). Pectinase é o termo utilizado para designar a mistura de enzimas pécticas, como foi recomendado pelo "Committee on Pectinn Nomenclature" em 1926 (LINEWEAVER & JANSEN, 1951). As enzimas pectinolíticas são produzidas principalmente por bactérias, fungos, leveduras e plantas superiores (ROMBOUTS & PILNINIK, 1986; THIBAUT & MERCIER, 1978). Bactérias do gênero *Erwinia*, fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Coniothyrium*, *Monillia*, *Penicillium* e *Esclerotinia*, e espécies de leveduras como *Saccharomyces cerevisae*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum lactis* têm sido descritos como produtores de enzimas pectinolíticas (REXOVÁ-BENKOVÁ & MARCOVIC, 1976; BARASH et al., 1984; McMILLAN et al., 1992; BEHERE et al., 1993; BRUMANO et al., 1993).

Protopectinases catalisam a solubilização da protopectina, formando substâncias pécticas altamente polimerizadas (SAKAI et al., 1993; YOSHITAKE et al., 1994).

As enzimas pécticas são, de maneira geral, classificadas de acordo com o seu modo de ação sobre a estrutura galacturônica da pectina e se distinguem em dois importantes grupos: as enzimas desesterificantes (pectinesterases) e as hidrolizantes de cadeias (despolimerases) (ROMBOUTS & PILNIK, 1980; FOGART & KELLY, 1983).

As pectinesterases (PE) são enzimas que catalisam a remoção dos grupos metílicos da molécula de pectina, produzindo metanol e ácidos pécicos. Seus pontos preferidos de ataque à molécula de pectina são, provavelmente, grupos metil éster adjacente a grupos carboxil livres. Pectinesterase é classificada como carboxi-éster-hidrolase (E.C. 3.1.1.11), recebendo freqüentemente as denominações de pectinametilesterases, pectina desmetoxilase, pectase, pectolipase ou pectina metoxilase (WHITAKER, 1984).

Figura 02 - Fragmento de uma molécula de pectina e o ponto de ataque de uma pectinesterase.

As enzimas do tipo despolimerizantes catalisam a quebra das ligações glicosídicas por hidrólise (hidrolases) ou por β -eliminação (liases). As despolimerases que atuam por hidrólise e têm como substrato o pectato são chamadas poligalacturonases (PG), e são divididas em endopoligalacturonases (E.C.3.2.1.15) e exopoligalacturonases (E.C.3.2.1.67), e as que degradam preferencialmente substratos com alto grau de esterificação são denominadas polimetilgalacturonases (PMG).

Figura 03 – Esquema de clivagem das ligações glicosídicas α - 1,4 pela enzima poligalacturonase.

Um outro tipo de enzima despolimerizante, as liases, são classificadas em pectina liase e pectato liase. A pectina liase (E.C.4.2.2.3) atua ao acaso nas ligações alfa 1,4 da molécula de pectina, e exopectina liase ou poli (metoxigalacturonato) liase (E.C.4.2.2.10) que atua nas extremidades da cadeia da pectina. As pectina liases quebram, preferencialmente, as ligações alfa 1,4 das D-galacturanas altamente metiladas, com produção de oligo-D-galacturonatos esterificados insaturados. A extensão da degradação e a afinidade da enzima pelo substrato dependem do grau de esterificação e de polimerização da molécula do substrato (REXOVÁ-BENKOVÁ & MARKOVIC, 1976).

A pectato liase, degrada substâncias com baixo grau de esterificação, pelo mecanismo de transeliminção, atuando após a pectinesterase (TSUYUMU & MIYAMOTO, 1986).

Figura 04- Fragmento de uma molécula de pectina e o ponto de ataque de uma pectina liase.

O estudo das pectinases tem sido considerado de grande importância, em razão da aplicação nas indústrias que processam matéria prima vegetal, para remoção das substâncias pécticas, as quais, se mantidas inviabilizam o produto desejado (GHILDYAL et al., 1981; WHITAKER, 1984). Na natureza, as enzimas pécticas estão envolvidas em processos fisiológicos, tais como, alterações em frutas e fitopatogenicidade.

A composição dos complexos enzimáticos pectinolíticos varia entre as espécies de microrganismos. Portanto, a seleção de linhagens capazes de sintetizar enzimas adequadas é um processo fundamental para a indústria (UEDA et al., 1982; EL-REFAI et al., 1984).

As preparações enzimáticas utilizadas industrialmente são de origem fúngica (UEDA et al., 1982; LEUCHTENBERGER et al., 1989). As enzimas pectinolíticas produzidas por microrganismos não-patogênicos são amplamente utilizadas na indústria de alimentos, seja na clarificação de sucos e vinhos ou ainda, na cura do cacau e do café. Por outro lado, na indústria têxtil, o uso das pectinases na degomagem de fibras naturais (GHILDYAL et al., 1981; BEHERE et al., 1993; FAWOLE & ODUNFA, 1992), visa substituir os processos

tradicionais que utilizam substâncias caústicas na degomagem das fibras, desde que o fungo que as produz não apresente atividade celulolítica que viria a prejudicar a resistência da fibra.

As preparações de enzimas pécticas, obtidas industrialmente por fungos do gênero *Aspergillus*, destacando-se o *Aspergillus niger*, recebem o nome comercial de “pectinases”, e são compostas de pectinesterases, poligalacturonases e pectina liase (ROMBOUTS & PILNIK, 1986). Além do gênero mencionado anteriormente, PARK et al. (1972) referem-se a outros fungos filamentosos que se prestam a este propósito : *Fusarium*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Rhizopus* e *Monillia*, dentre vários que vêm sendo avaliados quanto à sua capacidade de produção de pectinases.

Muitas das pectinases comerciais são de origem fúngica e foram caracterizadas como enzimas extracelulares. Somente os fungos ascomicetos e deuteromicetos têm-se mostrado capazes de produzir tais enzimas, destacando-se como melhores produtores, os gêneros *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* e *Fusarium*.

As reações de hidrólise enzimática da pectina por microrganismos são importantes no processo de liberação de fibras de celulose da parede celular, de interesse para a indústria têxtil. Esta desagregação das fibras, por meio da solubilização das substâncias pécticas da parede celular, constitui a degomagem (MEDINA, 1959).

A obtenção de fibras naturais vegetais como sisal, cânhamo, juta, rami, linho e malva, envolve o processo de degomagem, já que essas fibras celulósicas são interligadas por material péctico (ROSEMBERG, 1975). Essas substâncias podem ser retiradas por meio de tratamentos químicos ou enzimático (SHARMA, 1987). A degomagem das fibras naturais por combinação dos tratamentos químico e enzimático diminui a poluição ambiental, e a qualidade das fibras se sobressai sobre as obtidas apenas pelo processo de degomagem química (DESHPANDE & GURUCHARANAM, 1985).

As preparações industriais de enzimas pécticas existentes no mercado são, usualmente, uma mistura de enzimas hidrolíticas, dentre elas as pectinases e as celulasas. Entretanto, como já comentado, no processo de degomagem de fibras celulósicas, a presença de celulasas enfraquece essas fibras, comprometendo a qualidade do produto.

As características de produção de enzimas por microrganismos são muito variada em termos de biossíntese, já que podem ser reguladas tanto positiva quanto negativamente. Determinando-se as condições ideais para a produção da enzima de interesse, torna-se possível a obtenção de preparações livres de proteases ou outras enzimas indesejadas (DEMAIN, 1971; FIEDUREK et al., 1989). Aspectos importantes referentes à produção de enzimas microbianas têm sido relatados na literatura científica. Os procedimentos adotados na produção variam de acordo com os interesses da empresa produtora (WALLERSTEIN, 1911; BECKHORN et al., 1960; BECKHORN et al., 1965). Contudo, os métodos mais utilizados podem ser classificados como: de cultura submersa e de cultura semi-sólida (PARK, 1986).

Existem controvérsias, no que diz respeito ao melhor método a ser empregado. Segundo PARK (1986), várias enzimas fúngicas são produzidas com melhores resultados pelo método de cultura semi-sólida.

Em contraste, ANSTRUP et al. (1979) mencionam que o método de cultura submersa domina hoje a produção de enzimas devido aos reduzidos riscos de contaminação, além do que, os métodos modernos de controle de contaminantes podem ser mais facilmente adaptados a esse tipo de cultivo.

Entre 80 isolados selvagens avaliados para produção de enzimas pectinolíticas, FAWOLE & ODUNFA (1992) detectaram altos níveis de atividade nos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*, sendo que todos os *Aspergillus* (17,5% do total) eram pectinolíticos. Esses isolados foram avaliados em meios sólidos, comparando-se o halo de degradação formado em meios de cultura específicos para detecção de pectina liase ou poligalcturonase.

BARACAT et al. (1989) avaliaram diversas espécies de *Aspergillus*, de *Penicillium*, uma de *Eupenicillium* e uma de *Humicola* visando selecionar um fungo pectinolítico para degomagem de fibras naturais. As melhores linhagens foram de *Penicillium*, sendo a *P. versicolor* #1 a melhor produtora de pectinase total e a de *P. expansum* a melhor produtora de poligalacturonase. Nesse trabalho, a *Humicola* sp., a *A. fumigatus* #4 e a *E. ehrlichii* foram cultivadas a 40°C, e as demais a 28°C. SAID et al. (1991) comunicaram detecção de atividade de PL em pH inicial entre 7 e 8 para *P. frequentans*.

BRUMANO et al. (1993), que também desenvolveram seu trabalho visando a a degomagem de fibras têxteis, constataram em *Penicillium griseoroseum*, que a atividade ótima para enzimas pectinolíticas ocorreu em pH próximo ao neutro e temperaturas elevadas, condições estas ideais para uso no processamento de materiais vegetais porque essas altas temperaturas são suficientes para limitar o crescimento de contaminantes mesofílicos e podem agir como um processo de pasteurização. Em relação ao pH, ressaltam que as enzimas poderão ser aplicadas diretamente sobre o tecido vegetal sem necessidade de modificação do mesmo. Esses autores compararam também o desempenho da enzima comercial Flexzyme® com a que obtiveram de *P. griseoroseum*, constatando após 72 horas de tratamento fibras mais macias no tratamento com a enzima comercial, mas também significativamente mais fracas, uma vez que aquele produto um complexo enzimático, provavelmente não é isento de celulasas. Por outro lado, os autores ressaltaram a utilização, e estudo comparativo, de enzima obtida de uma linhagem selvagem, cujos índices de atividade pectinolítica poderão ser elevados num programa de melhoramento genético.

Em termos de melhoramento genético, LEUCHTENBERGER & MAYER (1991) comunicaram uma elevação de duas a três vezes na produção de PG e PL, em mutantes de *A. niger*.

FERNANDES-SALOMÃO et al. (1996), obtiveram mutantes de *Penicillium expansum* com elevação de duas vezes na produção tanto para PL como para PG, em relação à linhagem original.

DESHPANDE & GURUCHARANAN (1985) trabalharam com *A. versicolor* e relatam sucesso na degomagem de fibras de rami usando fungos selecionados para a degradação de pectinas. Também foi constatada relação direta entre concentração do inóculo e separação das fibras e ainda, que o pré-tratamento das fibras brutas de rami com álcalis acelerou a degomagem, mas se constituiu num tratamento que eleva o potencial poluidor do processo de degomagem das fibras. Nesse trabalho constatou-se que a resistência da fibra permaneceu intacta.

SIÉSSERE & SAID (1989), também caracterizaram e selecionaram linhagens de *Talaromices flavus*, *Tubercularia vulgaris* e *P. charlessi* segundo critério de capacidade de síntese de enzimas pectinolíticas extracelulares em cultura submersa e em meio sólido constituído por resíduos agroindustriais.

Bactérias também são utilizadas para a degomagem enzimática de fibras têxteis. DONAGHY et al. (1990) conduziram um estudo em que avaliaram as alterações na flora bacteriana de maceração anaeróbica de fibras de linho e constataram que das linhagens isoladas destes tratamentos e que demonstraram ter ação efetiva no processo de degomagem das fibras, foram numericamente dominantes de 10 a 40 horas, *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*, sendo sucedidas em dominância por *Clostridium acetobutylicum* e *Cl. felsineum*.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Linhagens utilizadas

Penicillium chrysogenum; IFO 4626

Trichoderma reesei QM 9414

Essas linhagens foram cedidas pelo Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

Variantes mutantes obtidos a partir da IFO 4626, no atual Laboratório de Ecogenética de Resíduos Agroindustriais, Setor de Ecogenética Bioquímica, do mesmo Departamento.

3.2- Manutenção das culturas em estoque

Utilizou-se tubos com tampa de rosca contendo aproximadamente 2/3 de seu volume preenchido com sílica. Conduziu-se este material à esterilização em forno de vidraria por 4 horas deixando as tampas de rosca levemente frouxas.

Preparou-se a seguinte solução: Leite em pó desnatado 10g, água destilada q.s.p. 100 mL. Foram transferidos 2 mL desta solução para tubos de ensaio sendo esterilizada em autoclave a 1 atm por 20 minutos.

3.3- Meios de Cultura

3.3.1- Meio Mineral para Microrganismos Celulolíticos (AMARAL et al., 1967).

KH_2PO_4	7,0 g
K_2HPO_4	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0,1 g
Extrato de Levedura	0,6 g
Celulose Sigma type 20	10 g
Ágar	15 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O pH foi ajustado a 5,5 e o meio de cultura esterilizado em autoclave a 0,5 atm por 30 minutos.

3.3.2- Meio Completo (PONTECORVO et al., 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973).

KH_2PO_4	1,5 g
MgSO_4	0,5 g
ZnSO_4	1 mg
FeSO_4	1 mg
KCl	0,5 g
NaNO_3	6,0 g
Dextrose	10,0 g
Solução de Vitaminas	1 mL

Peptona	2,0 g
Extrato de Levedura	2,0 g
Caseína Hidrolisada	1,5 g
Ágar	15,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

O pH foi ajustado a 6,8 e o meio de cultura esterilizado em autoclave a 0,5 atm por 30 minutos.

3.3.3- Meio Mineral Tampão Forte (MMTF) p H 7,2

K_2HPO_4	7,0 g
KH_2PO_4	2,0 g
$(NH_4)_2 SO_4$	1,0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,1 g
Pectina cítrica	3,0 g
Ágar (exceto em meio líquido)	15,0 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 0,5 atm por 30 minutos.

3.3.4- Meio Mineral Tampão Fraco (MMTf) p H 6,3

K_2HPO_4	2,0 g
KH_2PO_4	0,62 g
$(NH_4)_2 SO_4$	1,1 g
$MgSO_4.7H_2O$	1,0 g
Pectina cítrica	3,0 g

Ágar (exceto em meio líquido)	15,0 g
Água destilada q.s.p	1000 mL

O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 0,5 atm por 30 minutos.

3.4- Soluções e Reagentes

3.4.1- Substrato para Pectina Liase (PL)

Solubilizar 1% pectina cítrica (Sigma) em tampão Sörensen pH 6,8.

3.4.2- Substrato para Poligalacturonase (PG)

- 0.3 % de Ácido poligalacturônico (Sigma)
- NaCl 2.5 M

Procedimento:

- Dissolver o ácido Poligalacturônico em $\pm$ 20 mL de água destilada;
- Verter em 100 mL de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,8 (sob agitação);
- Lavar o becker com 8 mL de solução de NaCl 2.5 M (4 mL para cada 100 mL de substrato preparado) e verter no tampão (becker onde foi dissolvido o ácido poligalacturônico);
- Acertar o pH para 4,8 com NaOH 1N;
- Completar o volume com água destilada para 200 mL.

3.4.3- Reagente DNS - Ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959)

DNS	10 g
NaOH 2N	300 mL
Tartarato duplo Na/K	300 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Dissolver o DNS em aproximadamente 500 mL de água destilada, a seguir vagarosamente adicionar a solução de NaOH 2N e depois o Tartarato duplo de Sódio e Potássio. Após a dissolução total, completar o volume.

Antes de utilizar o DNS adicionar: 70µL de Metabissulfito de Sódio (solução estoque a 35%) e 200 µL de Fenol (solução estoque a 50%) para cada 50 mL do reagente DNS a ser utilizado.

3.4.4- Solução Tampão de Sörensen 100 mM pH 6,8

A) KH_2PO_4	13,60 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
B) Na_2HPO_4	17,42 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Misturar a solução A com a solução B até obter o pH 6,8. Conservar as soluções sob refrigeração. Preparar a solução tampão no momento do uso.

3.4.5- Solução Tampão Acetato de Sódio 100 mM pH 4,8

A) Acetato de Sódio	13,60 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

B) Ácido Acético	6 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Misturar a solução A com a solução B até obter o pH 4,8. Conservar as soluções sob refrigeração. Preparar a solução tampão no momento do uso.

3.4.6- Solução Tampão Acetato de Sódio 100 mM pH 4,4

Preparar de acordo com o item 3.4.5, ajustando o pH para 4,4, distribuir 9 mL em tubos de ensaio e esterilizar em autoclave a 0,5 atm por 30 minutos.

3.4.7- Solução Tampão Fosfato de Potássio 0,05 M pH 7,0

A) KH_2PO_4	6,80 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
B) K_2HPO_4	8,71 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Misturar a solução A com a solução B até obter o pH 7,0. Distribuir 9 mL por tubo de ensaio e esterilizar a 0,5 atm por 30 minutos.

3.4.8- Solução Tampão Fosfato de Sódio 0,2M pH 7,0

A) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	27,60 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
B) Na_2HPO_4	28,4 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Misturar a solução A com a solução B até obter o pH 7,0. Conservar as soluções sob refrigeração.

3.4.9- Solução Nitrito de Sódio

Preparar uma solução 0,5 M de nitrito de sódio (0,345 g em 10 mL de H₂O destilada e esterilizada). A solução deverá ser preparada no momento de sua utilização.

3.4.10- Tween 80

Tween 80 (Sorbitan Monooleato de Polioxietileno) 0,1% em água destilada. Alíquotas de 2,5 mL dessa solução foram colocadas em tubos de ensaio, autoclavadas a 0,5 atm por 30 minutos e conservadas em refrigerador.

3.4.11- Solução Salina 0,85%

NaCl	85,0 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Distribuir 9,0 mL da solução em tubos de ensaio, esterilizar em autoclave a 0,5 atm por 20 minutos.

3.4.12- Solução Cloreto de Sódio 2,5 M

NaCl	146,10 g
------	----------

Água destilada q.s.p. 1000 mL

Conservar a solução sob refrigeração.

3.4.13- Solução de Vitaminas

Ácido nicotínico	100,0 mg
Ácido p-amino benzóico	10,0 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	100,0 mg
Tiamina	50,0 mg

Colocar a solução em banho-maria fervente durante 20 minutos, conservando-a posteriormente em frasco escuro sob refrigeração.

3.4.14- Solução de Brometo hexadeciltrimetilamônio a 1 %

Dissolver 1 g de Brometo hexadeciltrimetilamônio em água destilada e completar o volume para 100 mL.

3.4.15- Solução de Albumina

Solução de albumina 50 % (v/v) em glicerina, preparada com clara de ovo filtrada. Depois de pronta conservar em refrigerador.

3.4.16- Solução de HCl 0,1 N

HCl concentrado	82,5 mL
Água destilada q.s.p	1000 mL

Conservar a solução em frasco escuro e temperatura ambiente.

3.4.17- Solução de HCl 0,01 N

A partir de uma solução de HCl 0,1 N: diluir 1 parte desta solução para 9 partes de água destilada.

Conservar a solução em frasco escuro e temperatura ambiente.

3.4.18- Solução de Giemsa 1 %

Giemsa	1,0 g
Glicerina	66,0 mL
Metanol	66,0 mL

Dissolver o Giemsa em glicerina a 60°C. Após resfriamento à temperatura ambiente adicionar metanol. Filtrar e conservar a solução à temperatura ambiente.

3.4.19- Solução de NaOH 2 N

Dissolver 80 g de NaOH e completar o volume com água destilada a 1 L em balão volumétrico. Conservar a solução em frasco plástico à temperatura ambiente.

3.5- Obtenção de Esporos

Das linhagens em estoque a foram retiradas pequenas quantidades de esporos através de alça de platina estéril e inoculados em placas contendo o meio completo. A nova cultura foi incubada em estufa por um período de 8 dias à temperatura de 28°C.

3.6- Suspensão de Esporos

A partir do crescimento das linhagens em placas de Petri contendo meio completo, coletaram-se os esporos através da raspagem da superfície da placa utilizando-se alça de platina, transferindo-os para tubos de ensaio contendo solução estéril de Tween 80 a 0,1 %, agitou-se vigorosamente os tubos em Vortex e 1 mL dessa suspensão foi adicionada ao tubo de ensaio contendo 9 mL de solução estéril de salina a 0,85 % seguindo-se a contagem do número de esporos por mL de suspensão em câmara de Neubauer sob microscópio óptico.

3.7- Concentração de Inóculo

Feita a contagem do número de esporos por mL na suspensão de esporos, diluiu-se convenientemente as amostras em solução salina a 0,85%, ajustando-se o inóculo em 10^7 esporos por mL, sendo este o padrão todos os ensaios de crescimento em meios de cultura líquidos.

3.8- Avaliação e Seleção das Linhagens em Meio Sólido

As linhagens foram avaliadas quanto à produção de enzimas extracelulares através de inóculo em placas contendo os meios de cultura: meio mineral tampão forte (MMTF) pH 7,2 e meio mineral tampão fraco (MMTf) pH 6,3 contendo 0,3% de pectina Dyne®.

Para a visualização do halo de degradação da pectina, utilizou-se o Método Semi-Quantitativo estabelecido por HANKIN & ANAGNOSTAKIS, (1975 modificado). As linhagens foram inoculadas em três pontos equidistantes na placa e incubadas por três dias a 28°C. Após o período de incubação, os diâmetros das colônias foram medidos e, em seguida, cobriu-se a superfície das placas com cerca de 5 mL da solução aquosa de brometo hexadeciltrimetilamônio a 1 %, reveladora do halo de degradação da pectina, aguardou-se cerca de 30 minutos para que ocorresse a reação substrato/solução. Em seguida, esgotou-se o excesso de solução das placas e tomou-se as medidas do diâmetro do halo e da colônia. O índice enzimático foi estimado pela relação: diâmetro do halo/diâmetro da colônia (FUNGARO, 1990).

3.9- Técnica Citológica (TANAKA et al., 1979)

Foram realizadas observações citológicas através da coloração de núcleos, estimando-se o número de núcleos por esporos.

Para a obtenção dos esporos, a linhagem IFO 4626 de *Penicillium chrysogenum* foi previamente cultivada em meio completo (PONTECORVO et al., 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973), durante 8 dias a 28°C.

Os esporos a serem corados foram aderidos a lamínulas, através de solução de albumina e secas levemente sob um bico de Bunsen. O material foi fixado por 30 minutos em solução de álcool etílico e ácido acético 3:1, à temperatura ambiente. A seguir o material foi hidratado por tratamentos

sucessivos em álcool etílico 95% por 5 minutos e álcool etílico a 70% por 30 minutos. A hidrólise foi feita em solução de ácido clorídrico 1 N a 60°C durante 12 minutos. Após esse período as lamínulas foram lavadas por três vezes com água destilada e imersas na solução de giemsa 1% mais tampão fosfato 0,2 M pH 7,0 (1:5) durante 30 minutos. O excesso do corante foi retirado por lavagem com tampão fosfato 0,2 M pH 7,0 e as lamínulas colocadas em lâminas e observadas em microscópio óptico.

3.10- Estabelecimento da Curva de Sobrevivência à Luz Ultravioleta

A partir da linhagem IFO 4626 de *Penicillium chrysogenum* fez-se uma suspensão dos conídios em solução salina contendo aproximadamente 10^6 esporos por mL. Um volume de 10 mL dessa suspensão foi colocado em uma placa de Petri estéril, e mantida à distância de 20 cm de uma fonte de luz ultravioleta. Antes do início da execução da irradiação, retirou-se uma alíquota de 1,0 mL como controle (tempo zero). A suspensão de conídios foi exposta durante 0, 1, 2, 3, 4, e 5 minutos à fonte de luz ultravioleta, sendo retiradas alíquotas de 1,0 mL da placa após cada período seguindo-se as diluições convenientes em solução salina. Tal como o controle, 0,1 mL das amostras irradiadas e apropriadamente diluídas em solução salina 0,85 %, foram semeadas em placas de Petri contendo meio completo (PONTECORVO et al., 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973). As placas foram incubadas em estufa a 28°C por 72 horas, decorrido esse período procedeu-se a contagem do número de colônias.

A porcentagem de sobrevivência foi estimada em relação ao número de colônias obtidas no tratamento controle (tempo zero), tomado como 100 % de sobrevivência.

3.11- Estabelecimento da Curva de Sobrevivência ao Ácido Nitroso

A partir da linhagem mutante M 85 (isolada no 1º ciclo de mutação-seleção), preparou-se uma suspensão de esporos contendo cerca de 10^7 esporos/mL e adicionou-se ao tubo de ensaio contendo 0,33 mL de solução de nitrito de sódio 0,5 M e solução tampão acetato de sódio pH 4,4. Para o controle (tempo zero) retirou-se imediatamente uma alíquota de 1,0 mL e adicionou-se ao tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,0, e assim, sucessivamente após a cada período de tratamento com ácido nitroso para a neutralização da reação;

Os tubos contendo as suspensões foram incubados a 30°C em banho-maria durante o tratamento. Ao término de cada período de exposição da linhagem ao ácido nitroso: 0, 5, 10, 20, 40, 50, 60, e 70 minutos, diluições convenientes foram feitas e 0,1 mL de cada suspensão foi semeado em placas com meio completo, incubadas em estufa a 28°C por três dias.

Calcula-se a porcentagem de sobrevivência para os diferentes intervalos de tempo em relação ao controle (tempo zero) considerado com o nível de 100% de sobrevivência.

3.12- Isolamento de Mutantes

Após o estabelecimento dos tempos ideais de tratamento para a obtenção de 5 % de sobreviventes das linhagens IFO 4626 e M 85, através de radiação ultra-violeta e exposição a ácido nitroso respectivamente, e obtidas placas com colônias originadas de esporos sobreviventes ao tratamento, esses possíveis mutantes foram isolados um a um e identificados, sendo que para os originados da linhagem IFO 4626 a identificação foi feita pela letra M seguida de numeração em ordem crescente, de acordo com a seqüência de isolamento das colônias, enquanto que para os originados da linhagem M 85, a

denominação foi feita pela letra L seguida de numeração em ordem crescente, na seqüência de isolamento das colônias.

3.13- Condições de Cultivo em Meio Líquido

Os fungos foram inoculados em meio de cultura líquido, contendo pectina cítrica (Dyne®) na concentração de 0,3% como única fonte de carbono. Aos erlenmeyers em número de três por linhagem, cada um contendo 50 mL de meio de cultura foi inoculado 1 mL das suspensões contendo 10^7 esporos/mL e mantidos em agitador rotacional a 150 rpm, à temperatura de 28°C, por um período de 120 horas de crescimento, sendo coletadas amostras a cada 24 horas.

3.14- Determinação da Massa Micelial

Para a determinação da massa micelial, produzida ao longo do período de cultivo, após a filtração à vácuo em papel de filtro com seu peso previamente identificado, o micélio obtido foi lavado com água destilada e seco em estufa a 55°C até peso constante.

3.15- Determinação da Atividade da Poligacturonase (PG)

A atividade da PG foi determinada pela dosagem de açúcares redutores usando-se o método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), e o ácido D⁺ galacturônico como padrão.

A mistura da reação consistiu de 1,0 mL do filtrado da cultura e 1,0 mL de solução de ácido poligalacturônico (Sigma®) a 0,3% (p/v), em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4,8.

Aliquotas de 0,25 mL são retiradas nos tempos 0 ("branco" da reação) e 20 minutos de reação em banho-maria a 40°C e adicionada a tubos contendo 1,0 mL do reagente DNS + 0,75 mL de água destilada;

A seguir os tubos são levados ao banho-maria fervente por 5 minutos; após a fervura completa-se o volume das amostras até 10,0 mL e procede-se à leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

Uma unidade de atividade de PG foi definida como μ moles de ácido galacturônico liberados por mL de filtrado por minuto de reação.

3.16- Determinação da Atividade da Pectina Liase (PL)

A atividade da PL foi determinada pelo aumento da absorbância a 235nm, como descrito por ALBERSHEIM e KILLIAS (1962).

A mistura da reação constitui-se de 1 mL de substrato (pectina cítrica – Sigma®) 1,0% (p/v) em tampão Sørensen 100 mM, pH 6,8 e 1,5 mL do filtrado da cultura.

Mantida a reação a 40°C, alíquotas de 0,5 mL da mistura da reação foram retiradas nos tempos 0 e 30 minutos de reação e adicionadas a 4,5 mL de HCl 0,01N para interromper a reação;

Após o tempo zero (controle) e o tempo 30 minutos de reação foi feita a leitura em espectrofotômetro em UV a 235 nm.

A atividade enzimática de pectina liase (Unidades de PL) foi definida como nmoles de produto insaturado liberados por mL de filtrado por minuto, na temperatura de reação. Utilizou-se para o cálculo da atividade enzimática o coeficiente de extinção molar de 5550 (ALBERSHEIM, 1966).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Caracterização citológica da linhagem IFO 4626 de *Penicillium chrysogenum*.

Sendo o presente estudo preliminar à seleção de linhagem adequada ao melhoramento genético, tornou-se importante identificar o número de núcleos por esporos na linhagem IFO 4626. Utilizando-se a técnica de coloração de núcleos de TANAKA et al. (1979), identificou-se apenas esporos uninucleados na mesma. Foi feita a contagem do número de núcleos de 300 esporos.

Figura 5- Núcleos de conídios da IFO 4626 de *P. chrysogenum*. aumento 1000x

4.2- Curva de Sobrevivência a Luz Ultravioleta.

Os conídios da linhagem IFO 4626 de *P. chrysogenum* foram submetidos à luz ultravioleta com intervalos de tempo 0, 1, 2, 3, 4, 5 minutos. A figura 6 ilustra os resultados de viabilidade dos conídios, obtidos nesta mutação, indicando o tempo aproximado de 4 minutos como necessários a se alcançar 5% de sobreviventes, percentual este reconhecido como o que maximiza a obtenção de mutantes. Segundo BURNETT (1975), geralmente verifica-se que um efetivo rendimento de mutantes só é alcançado quando a proporção de sobreviventes do material submetido a mutação é muito baixa, entre 1 % a 5 %.

Entre 390 colônias isoladas e analisadas conforme MOLINA et al.,(in press) após o tratamento com a luz ultravioleta, selecionou-se os 38 mutantes de maiores índices enzimáticos, superiores à IFO 4626 quanto a produção de pectinases.

4.3- Curva de Sobrevivência ao Ácido Nitroso.

A linhagem mutante M 85 de *P. chrysogenum* foi submetida à radiação com ácido nitroso com os tempos de tratamento: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 minutos. A figura 7 ilustra os resultados de viabilidade dos conídios, obtidos nesta etapa. Utilizando-se o ácido nitroso como agente mutagênico, a mesma taxa de 5 % de sobrevivência dos conídios requerida no tratamento anterior foi mantida e o tempo necessário a sua obtenção foi aproximadamente 60 minutos.

Após o tratamento com ácido nitroso, foram isolados e analisados 410 colônias selecionando-se 8 mutantes superiores quanto à produção de enzimas pectinolíticas extracelulares.

Figura 6- Curva de sobrevivência da linhagem IFO 4626 de *P. chrysogenum* à luz ultra violeta.

Figura 7- Curva de sobrevivência da linhagem mutante M 85 de *P. chrysogenum* ao ácido nitroso.

4.4- Avaliação das Atividades Enzimáticas das Linhagens.

4.4.1- Avaliação de Pectinases em Meio de Cultura Sólido.

A avaliação de pectinases extra celulares foi realizada em placas de Petri contendo os meios de cultura sólido MMTF pH 7,2 e MMTf pH 6,3 e através da medida do halo de degradação da pectina presente no meio de cultura foi possível estimar semi-quantitativamente a produção de enzimas extracelulares. Por meio da análise dos índices enzimáticos referentes à atividade de pectinases. Em meio de cultura sólido, constatou-se efeitos distintos entre os meios testados e entre as linhagens estudadas, 38 mutantes do primeiro ciclo de mutação-seleção e 8 do segundo (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos de meio e linhagem quanto à atividade de pectinases - Análise de Variância.

Causas de Variação	GL	QM	Prob. >F
Meio	1	3,496	0,00001
Linhagem	46	9,785	0,00001
Meio * Linhagem	46	0,541	0,00001
Resíduo	188	0,023	
Total	281		
Média Geral = 2,236		C.V. = 6,767%	

Estudando-se o efeito dos dois meios de cultura sólidos sobre as atividades de pectinases constatou-se em termos de média geral, superioridade dos dados obtidos no MMTf (Tabela 2), o que não se manteve para as análises bioquímicas em meio líquido, conforme se pode verificar adiante, nas seções sobre atividade de PL e de PG.

Conduzindo-se essa análise independentemente para cada linhagem individualmente, constatou-se que não houve diferença significativa de atividade induzida pelos MMTF e MMTf para a maioria delas linhagens: a original, IFO

4626 e diversos mutantes do 1º ciclo, induzido por luz U.V., M 86, M 223, M 240, M 272, M 279, M 281, M 283, M 239, M 304, M 308, M 309, M 314, M 320, M 322, M 325, M 349, M 350, M 359, M 364, M 367, M 370, M 372, M 373, M 378 e M 381. Pode-se considerar que para essas linhagens não há efeito de pH sobre a atividade pectinolítica em meio sólido, uma vez que a diferença fundamental entre os meios estudados encontra-se nos valores de pH, que para o MMTf é de 6,3, e para o MMTF é de 7,2, sendo que as atividades das enzimas pectinolíticas estudadas tendem a ser favorecidas respectivamente, em meio mais ácido, a de PG, e em meio de pH mais elevado, a de PL.

Foram favorecidas pelo MMTf sólido, pH 6,3, as atividade de pectinases das seguintes linhagens: M 85, M 266, M 239, M 296, M 301, M 321, M 376 e todas as do segundo ciclo de mutação, induzido pelo ácido nitroso L 80, L 85, L 94, L 135, L 142, L 189, L 204 e L 296. Ao contrário, tiveram sua atividade de pectinases favorecida em MMTF sólido, pH 7,2, as seguintes linhagens, M 87, M 243, M 287, M 305, M 313 e M 434. É interessante observar que as linhagens de maior atividade enzimática encontraram-se reunidas no grupo de maior atividade em MMTf, pH 6,3, como pode ser verificado confrontando-se os presentes resultados (Tabela 2) com os apresentados adiante, referente ao desempenho comparado entre as linhagens (Tabelas 3 e 4).

No MMTF observou-se que a linhagem de maior índice enzimático originou-se no 2º ciclo de seleção, a L 85, sendo esta superior a todas as demais, seguida em diferentes agrupamentos, pelas demais linhagens desse ciclo. Entre os mutantes do 1º ciclo, destacou-se a M 85, a qual já fora previamente selecionada para dar origem às linhagens do 2º. Entre as 38 linhagens selecionadas como as melhores do 1º ciclo, nenhuma foi significativamente inferior à IFO 4626, que lhes deu origem, embora a seleção preliminar tenha sido feita no meio de HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975), no qual foram significativamente superiores àquela (Tabela 3).

No MMTf, novamente destacou-se entre as demais linhagens, o índice enzimático obtido pela linhagem L 85, seguindo-se pelos valores das outras

linhagens do 2º ciclo de mutação seleção. Nesse meio, entretanto, ocorreu sobreposição entre os ciclos, porque a M 85, superior no 1º ciclo, superou de modo estatisticamente significativo, o índice da L 189 e sem significância estatística, o valor apresentado pela L 80. Também nesse meio não houve linhagens melhoradas com atividade significativamente inferior à da IFO 4626, linhagem da qual se originou os ciclos de mutação-seleção, (Tabela 4). Aspectos morfológicos dessas colônias cultivadas em diferentes meios podem ser vistos nas figuras adiante. Em meio completo, figura 8; em MMTF, figura 9 e em MMTf, figura 10. Nessas duas últimas figuras são mostrados também os halos de degradação de pectina, formados no meio de cultura sólido.

A partir desses resultados, selecionou-se para a continuidade dos experimentos para o detalhamento dos estudos enzimáticos, as linhagens IFO 4626 (controle), M 85 e L 85.

Cabe observar que a identificação de mutantes superiores em meio sólido foi empregada como um método eficiente e rápido para seleção dos mesmos, uma vez que haveria dificuldades para se avaliar, através de ensaios enzimáticos em meio líquido, o grande número de colônias isoladas a cada ciclo de mutação-seleção. No entanto os resultados obtidos mostraram que os valores de índice enzimático no meio sólido e os de atividade enzimática obtidos em filtrados de cultura diferiram amplamente como indicadores do ganho relativo de atividade dos mutantes quando comparados à linhagem que lhes deu origem, mantendo-se constante, entretanto, a indicação da superioridade dos melhores produtores. Tal fato pode ter ocorrido porque o índice enzimático em meio sólido estima a atividade de pectinases totais enquanto que os ensaios em meio líquido avaliam a atividade de um tipo específico de enzima, no caso, PL ou PG. Ou ainda, estar relacionado a um possível efeito das condições diferenciadas de cultivo, em meio sólido para índices enzimáticos e em meio líquido para posterior leitura da atividade enzimática de PL ou PG em espectrofotômetro.

Tabela 2. Teste de Tukey para médias de índice enzimático referente à atividade de pectinases em meio sólido.

Linhagem	Meio	Nº Rep.	Média	5%	1%
Todas	MMTf	141	2,35	A	A
	MMTF	141	2,13	b	B
(D.M.S. 5%= 0,035 D.M.S. 1% = 0,047)					
IFO-4626	MMTF	3	1,50	a	A
	MMTf	3	1,43	a	A
M 85	MMTf	3	4,58	a	A
	MMTF	3	3,64	b	B
M 86	MMTf	3	1,46	a	A
	MMTF	3	1,37	a	A
M 87	MMTF	3	1,89	a	A
	MMTf	3	1,27	b	B
M 223	MMTF	3	1,64	a	A
	MMTf	3	1,46	a	A
M 226	MMTf	3	1,83	a	A
	MMTF	3	1,43	b	B
M 234	MMTF	3	1,75	a	A
	MMTf	3	1,47	b	A
M 239	MMTf	3	2,05	a	A
	MMTF	3	1,64	b	B
M 240	MMTf	3	1,59	a	A
	MMTF	3	1,48	a	A
M 272	MMTF	3	1,27	a	A
	MMTf	3	1,17	a	A
M 279	MMTF	3	1,51	a	A
	MMTf	3	1,34	a	A
M 281	MMTf	3	1,53	a	A
	MMTF	3	1,38	a	A
M 283	MMTF	3	1,62	a	A
	MMTf	3	1,48	a	A
M 287	MMTF	3	1,66	a	A
	MMTf	3	1,22	b	B
M 293	MMTF	3	1,57	a	A
	MMTf	3	1,54	a	A
M 296	MMTf	3	3,62	a	A
	MMTF	3	3,01	b	B
M 301	MMTf	3	3,84	a	A
	MMTF	3	3,14	b	B
M 304	MMTF	3	1,56	a	A
	MMTf	3	1,32	a	A
M 305	MMTF	3	1,52	a	A
	MMTf	3	1,25	b	A
M 308	MMTf	3	1,67	a	A
	MMTF	3	1,61	a	A
M 309	MMTF	3	1,48	a	A
	MMTf	3	1,41	a	A
M 313	MMTF	3	1,78	a	A
	MMTf	3	1,38	b	B
M 314	MMTF	3	1,50	a	A
	MMTf	3	1,41	a	A
M 320	MMTF	3	1,53	a	A
	MMTf	3	1,43	a	A
M 321	MMTf	3	2,15	a	A
	MMTF	3	1,83	b	B
M 322	MMTF	3	1,63	a	A
	MMTf	3	1,62	a	A

Cont. tabela 2

Linhagem	Meio	Nº Rep.	Média	5%	1%
M 325	MMTF	3	1,62	a	A
	MMTf	3	1,55	a	A
M 343	MMTF	3	1,68	a	A
	MMTf	3	1,30	b	B
M 349	MMTf	3	1,71	a	A
	MMTF	3	1,52	a	A
M 350	MMTf	3	1,52	a	A
	MMTF	3	1,49	a	A
M 359	MMTf	3	1,82	a	A
	MMTF	3	1,70	a	A
M 364	MMTF	3	1,55	a	A
	MMTf	3	1,49	a	A
M 367	MMTf	3	1,82	a	A
	MMTF	3	1,62	a	A
M 370	MMTf	3	2,00	a	A
	MMTF	3	1,82	a	A
M 372	MMTf	3	1,52	a	A
	MMTF	3	1,42	a	A
M 373	MMTF	3	1,65	a	A
	MMTf	3	1,50	a	A
M 376	MMTf	3	1,93	a	A
	MMTF	3	1,61	b	A
M 378	MMTf	3	1,72	a	A
	MMTF	3	1,61	a	A
M 381	MMTF	3	1,75	a	A
	MMTf	3	1,67	a	A
L 80	MMTf	3	4,33	a	A
	MMTF	3	3,66	b	B
L 85	MMTf	3	6,92	a	A
	MMTF	3	5,17	b	B
L 94	MMTf	3	5,43	a	A
	MMTF	3	4,41	b	B
L 135	MMTf	3	5,99	a	A
	MMTF	3	4,03	b	B
L 142	MMTf	3	4,60	a	A
	MMTF	3	4,21	b	B
L 189	MMTf	3	4,04	a	A
	MMTF	3	3,65	b	B
L 204	MMTf	3	4,67	a	A
	MMTF	3	3,97	b	B
L 296	MMTf	3	6,28	a	A
	MMTF	3	3,82	b	B

D.M.S. 5% =0,243 D.M.S. 1% =0,320

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO

Tabela 3. Teste de Tukey para médias de Linhagens cultivadas em MMTF

Linhagem	N.º de Rep.	Médias	5%	1%
L 85	3	5,17	a	A
L 94	3	4,41	b	B
L 142	3	4,21	bc	BC
L 135	3	4,03	bcd	BCD
L 204	3	3,97	bcd	BCD
L 296	3	3,82	cd	CD
L 80	3	3,66	d	DE
L189	3	3,65	d	DE
M 85	3	3,64	d	DE
M 301	3	3,14	e	EF
M 296	3	3,01	e	F
M87	3	1,89	f	G
M321	3	1,83	fg	G
M 370	3	1,82	fg	GH
M 313	3	1,78	fg	GH
M 381	3	1,75	fgh	GH
M 234	3	1,75	fgh	GH
M 359	3	1,70	fgh	GH
M 343	3	1,68	fgh	GH
M 287	3	1,66	fgh	GH
M 373	3	1,65	fgh	GH
M 239	3	1,64	fgh	GH
M 223	3	1,64	fgh	GH
M 322	3	1,63	fgh	GH
M 283	3	1,62	fgh	GH
M 325	3	1,62	fgh	GH
M 367	3	1,62	fgh	GH
M 308	3	1,61	fgh	GH
M 378	3	1,61	fgh	GH
M 376	3	1,61	fgh	GH
M 293	3	1,57	fgh	GH
M 304	3	1,56	fgh	GH
M 364	3	1,55	fgh	GH
M 320	3	1,53	fgh	GH
M 349	3	1,52	fgh	GH
M 305	3	1,52	fgh	GH
M 279	3	1,51	fgh	GH
M 314	3	1,50	fgh	GH
IFO 4626	3	1,50	fgh	GH
M 350	3	1,49	fgh	GH
M 309	3	1,48	fgh	GH
M 240	3	1,48	fgh	GH
M 226	3	1,43	fgh	GH
M 372	3	1,42	fgh	GH
M 281	3	1,38	gh	GH
M 86	3	1,37	gh	GH
M 272	3	1,27	h	H

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO
DMS 5 % = 0,494 - DMS 1 % = 0,547

Tabela 4- Teste de Tukey para médias de Linhagens Cultivadas em MMTf

Linhagem	N.º de Rep.	Médias	5%	1%
L 85	3	6,92	a	A
L 296	3	6,28	b	B
L 135	3	5,99	b	B
L 94	3	5,43	c	C
L 204	3	4,67	d	D
L 142	3	4,60	d	D
M 85	3	4,58	d	DE
L 80	3	4,33	de	DEF
L 189	3	4,04	ef	EFG
M 301	3	3,84	ef	FG
M 296	3	3,62	f	G
M 321	3	2,15	g	H
M 239	3	2,05	gh	HI
M 370	3	2,00	ghi	HIJ
M 376	3	1,93	ghij	HIJK
M 226	3	1,83	ghijk	HIJKL
M 359	3	1,82	ghijk	HIJKL
M 367	3	1,82	ghijk	HIJKL
M 378	3	1,72	ghijkl	HIJKLM
M 349	3	1,71	ghijklm	HIJKLMN
M 308	3	1,67	ghijklm	HIJKLMN
M 381	3	1,67	ghijklm	HIJKLMN
M 322	3	1,62	hijklmn	IJKLMN
M 240	3	1,59	hijklmn	IJKLMN
M 325	3	1,55	ijklmn	IJKLMN
M 293	3	1,54	ijklmn	IJKLMN
M 281	3	1,53	ijklmn	IJKLMN
M 350	3	1,52	ijklmn	IJKLMN
M 372	3	1,52	ijklmn	IJKLMN
M 373	3	1,50	jklmn	JKLMN
M 364	3	1,49	jklmn	JKLMN
M 283	3	1,48	jklmn	JKLMN
M 234	3	1,47	jklmn	JKLMN
M 223	3	1,46	jklmn	JKLMN
M 86	3	1,46	jklmn	JKLMN
IFO 4626	3	1,45	jklmn	JKLMN
M 320	3	1,43	klmn	KLMN
M 314	3	1,41	klmn	KLMN
M 309	3	1,41	klmn	KLMN
M 313	3	1,38	klmn	KLMN
M 279	3	1,34	klmn	LMN
M 304	3	1,32	lmn	LMN
M 343	3	1,30	lmn	LMN
M 87	3	1,27	lmn	MN
M 305	3	1,25	lmn	MN
M 287	3	1,22	mn	MN
M 272	3	1,17	n	N

MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA INDICADO DMS 5 % = 0,494 - DMS 1 % = 0,547

Figura 8- Aspectos morfológicos das linhagens IFO 4626 (A); M 85 (B); L 85 (C), cultivadas em meio completo.

Figura 9- (A) Aspectos morfológicos das linhagens IFO 4626; M 85; L 85 (sentido horário) cultivadas em MMTF pH 7,2, com 3 dias de cultivo a 28°C; (B) Halo de degradação da pectina das linhagens IFO 4626; M 85; L 85 (sentido horário) cultivadas em MMTF pH 7,2, com 3 dias de cultivo a 28°C.

Figura 10- (A) Aspectos morfológicos das linhagens IFO 4626; M 85; L 85 (sentido horário) cultivadas em MMTf pH 6,3, com 3 dias de cultivo a 28°C; (B) Halo de degradação da pectina das linhagens IFO 4626; M 85; L 85 (sentido horário) cultivadas em MMTf pH 6,3, com 3 dias de cultivo a 28°C.

4.4.2- Avaliação da Atividade Celulolítica em Meio Sólido.

Como as enzimas obtidas visam a degomagem de fibras têxteis de natureza celulósica, tornou-se relevante que a atividade celulolítica da linhagens mutantes fosse a menor possível ou mesmo inexistente para não comprometer a qualidade e resistência das fibras. Buscou-se então caracterizar o crescimento e os aspectos morfológicos das linhagens em estudo, em meio mineral de celulose (AMARAL et al., 1967) a 28°C por 1 semana.

A figura 11 (A) ilustra a linhagem celulolítica empregada como testemunha a QM 9414 de *Trichoderma reesei*, que apresentou crescimento vigoroso. Por sua vez, a figura 11 (B) ilustra as linhagens IFO 4626, M 85 e L 85 (sentido horário), comprovando que as mesmas não apresentaram atividade celulolítica.

Figura 11- (A) Linhagem QM 9414 de *Trichoderma reesei*, (B) Linhagens IFO 4626, M 85 e L 85 (sentido horário) cultivadas em meio mineral para celulolíticos por 1 semana a 28°C.

4.4.3- Avaliação em Cultura Líquida.

4.4.3.1- Avaliação da Produção de Pectina Liase (PL) Através da Cinética de Crescimento.

Quanto à atividade de PL e atividade específica de PL, todos os fatores testados (meio, linhagem e tempo), bem como suas interações apresentaram-se altamente significativos (Tabela 5).

Tabela 5. Efeitos de meio, linhagem e tempo de tratamento sobre a atividade de PL – Análise de Variância.

Causas de Variação	GL	Atividade de PL (nMoles de prod. insat. mL ⁻¹ .min ⁻¹)		Atividade Específica de PL (nMoles de prod. insat. .mL ⁻¹ .min ⁻¹ .mg ⁻¹)	
		QM	Prob. >F	QM	Prob. >F
Meio	1	16956,197	0,00001	8794,072	0,00001
Linhagem	2	7543,041	0,00001	2502,918	0,00001
Tempo	4	2026,510	0,00001	821,718	0,00001
Meio * Linhagem	2	5589,457	0,00001	1796,745	0,00001
Meio * Tempo	4	4274,108	0,00001	1715,546	0,00001
Linhagem * Tempo	8	961,247	0,00001	72,368	0,00001
Meio*Tempo*Linhagem	8	1015,365	0,00001	57,150	0,00001
Resíduo	60	131,316		2,076	
Total	89				
		Média= 22,44 CV=6,59%		Média= 16,31 CV=8,83%	

Para a linhagem IFO 4626, quanto à atividade de PL, não houve diferença de efeito entre os meios testados com 24 h de tratamento. Entretanto, nos demais tempos testados (48, 72, 96 e 120h) evidenciou-se superioridade do MMTF. Para a linhagem M 85, observou-se o mesmo padrão de desempenho da linhagem IFO 4626. Já na linhagem L 85, constatou-se superioridade do MMTF em todos os tempos estudados (Tabela 6).

Quanto à atividade específica de PL, manteve-se os mesmos padrões observados para a atividade de PL, ou seja, para as linhagens IFO 4626 e M 85, não houve diferença de efeito entre os meios testados com 24 h de tratamento e nos demais tempos testados (48, 72, 96 e 120h) evidenciou-se superioridade do MMTF; para a linhagem L 85, constatou-se superioridade do MMTF em todos os tempos estudados (Tabela 6).

Tanto no MMTF como no MMTf, consideradas as médias de todos os tempos conjuntamente, o desempenho da linhagem L 85, quanto à atividade de PL foi superior ao das demais. No MMTF, seguiu-se a linhagem M 85 e então a IFO 4626. No MMTf, não houve diferença de desempenho entre essas duas últimas linhagens. O mesmo padrão foi observado para a atividade específica de PL (Tabela 7).

Para atividade de PL, em cultivo no MMTF, em todos os tempos testados, a linhagem L 85 foi superior às demais, sendo que nos tempos 24, 48 e 72 h as demais linhagens não diferiram entre si e nos tempos 96 e 120 h a M-85 foi significativamente superior à IFO 4626 (Tabela 8). No MMTf, não houve diferenças significativas entre as linhagens nos tempos 24, 96 e 120 h. Com 48 h foi superior o desempenho da L 85, seguindo-se as linhagens M 85 e a IFO 4626, diferindo significativamente entre si a 5% de probabilidade, mas não a 1%. Com 72 h manteve-se a mesma seqüência de linhagens, mas a M 85, intermediária não diferiu da superior, L 85, mas apenas da inferior IFO-4626 a 5% de probabilidade mas não diferiu dessa a 1% (Tabela 8).

Para atividade específica de PL no MMTF, a L 85 manteve-se superior, sendo que as demais não diferiram entre si nos tempos de cultivo 24 e 72 h e nos demais, 48, 96 e 120 h a intermediária, M 85 diferiu da inferior, IFO 4626 (Tabela 8). No MMTf não houve diferenças significativas entre as atividades específicas de PL nos tempos de cultivo 24, 96 e 120 h. No tempo 4 h, a L 85 foi superior às demais que a 5% de probabilidade não diferiram entre si e a 1% a intermediária, M-85 não diferiu dos extremos, o que ocorreu a 72 h tanto a 5 como a 1% de probabilidade (Tabela 8).

Tabela 6. Teste de Tukey para médias de atividade de PL e atividade específica de PL por meio, tempo de cultivo e linhagem.

Linhagem	Tempo de Cultivo	Atividade de PL (nMoles de prod. insat. mL ⁻¹ .min ⁻¹)						Atividade Específica de PL (nMoles de prod. insat. mL ⁻¹ .min ⁻¹ .mg ⁻¹)					
		Meio	Nº Rep.	Média	5%	1%		Meio	Nº Rep.	Média	5%	1%	
IFO4626	24h	MMTF	3	4,204	A	A		MMTF	3	4,297	a	A	
		MMTf	3	2,169	a	A		MMTf	3	3,034	a	A	
	48h	MMTF	3	15,215	a	A		MMTF	3	8,329	a	A	
		MMTf	3	7,040	b	B		MMTf	3	4,635	b	B	
	72h	MMTF	3	37,004	a	A		MMTF	3	22,299	a	A	
		MMTf	3	7,508	b	B		MMTf	3	4,915	b	B	
	96h	MMTF	3	32,432	a	A		MMTF	3	22,053	a	A	
		MMTf	3	10,343	b	B		MMTf	3	6,777	b	B	
	120h	MMTF	3	17,718	a	A		MMTF	3	11,521	a	A	
		MMTf	3	9,943	b	B		MMTf	3	6,845	b	B	
M 85	24h	MMTf	3	3,704	a	A		MMTf	3	3,046	a	A	
		MMTF	3	1,935	a	A		MMTF	3	2,003	a	A	
	48h	MMTF	3	16,383	a	A		MMTF	3	13,434	a	A	
		MMTf	3	10,444	b	B		MMTf	3	6,791	b	B	
	72h	MMTF	3	36,136	a	A		MMTF	3	21,857	a	A	
		MMTf	3	10,744	b	B		MMTf	3	7,600	b	B	
	96h	MMTF	3	42,643	a	A		MMTF	3	30,941	a	A	
		MMTf	3	9,276	b	B		MMTf	3	7,099	b	B	
	120h	MMTF	3	36,970	a	A		MMTF	3	28,257	a	A	
		MMTf	3	9,009	b	B		MMTf	3	6,833	b	B	
L 85	24h	MMTF	3	19,386	a	A		MMTF	3	17,810	a	A	
		MMTf	3	2,236	b	B		MMTf	3	2,745	b	B	
	48h	MMTF	3	47,982	a	A		MMTF	3	40,546	a	A	
		MMTf	3	15,682	b	B		MMTf	3	10,264	b	B	
	72h	MMTF	3	84,351	a	A		MMTF	3	60,262	a	A	
		MMTf	3	13,347	b	B		MMTf	3	9,248	b	B	
	96h	MMTF	3	73,473	a	A		MMTF	3	54,027	a	A	
		MMTf	3	11,211	b	B		MMTf	3	8,758	b	B	
	120h	MMTF	3	74,908	a	A		MMTF	3	54,309	a	A	
		MMTf	3	9,843	b	B		MMTf	3	8,892	b	B	

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO

D.M.S. 5% = 2,42

D.M.S. 1% = 3,21

D.M.S. 5% = 2,35

D.M.S. 1% = 3,13

Tabela 7. Teste de Tukey para médias de atividade de PL e atividade específica de PL por linhagem e meio de cultivo.

Atividade de PL (nMoles de prod. insat. mL ⁻¹ .min ⁻¹)						Atividade Específica de PL (nMoles de prod. insat. mL ⁻¹ .min ⁻¹ .mg ⁻¹)				
Meio	Linhagem	Nº de Rep.	Média	5%	1%	Linhagem	Nº de Rep.	Média	5%	1%
MMTF	L 85	15	60,020	a	A	L-85	15	45,391	A	A
	M 85	15	27,167	b	B	M-85	15	19,507	B	B
	IFO 4626	15	21,315	c	C	IFO-4626	15	13,670	C	C
MMTf	L 85	15	10,464	a	A	L-85	15	7,982	A	A
	M 85	15	8,212	b	B	M-85	15	6,065	b	B
	IFO 4626	15	7,401	b	B	IFO-4626	15	5,241	b	B
MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO										
D.M.S. 5% = 1,30						D.M.S. 5% = 1,26				
D.M.S. 1% = 1,64						D.M.S. 1% = 1,59				

Constatou-se alterações significativas no desempenho de todas as linhagens entre todos os tempos testados, uma vez que houve ajuste significativo dos dados a uma regressão de 4º grau (Tabela 9). Conforme mostrado na figura 2A, evidenciou-se um pico significativo de atividade de PL das linhagens IFO 4626 e L 85 em MMTF, a 72 h de cultivo e para a linhagem M 85 houve um pico de atividade a 96 h de cultivo.

A linhagem IFO 4626 cultivada em MMTf apresentou médias de atividade de PL que se ajustaram a uma regressão quadrática (Tabela 9). Conforme apresentado na figura 2C, a maior atividade ocorreu a 120 h de cultivo. No MMTf, a linhagem M 85 apresentou médias de atividade de PL que se ajustaram a uma regressão de 3º grau (Tabela 9). No tempo de cultivo de 72 h, ocorreu a maior atividade (figura 2C). A linhagem L 85 cultivada em MMTf apresentou médias de atividade de PL que se ajustaram a uma regressão de 4º grau (Tabela 9) e como mostrado na figura 2C, caracterizou-se um pico de atividade a 48 h. No meio de cultura MMTf houve superioridade da atividade de

PL da linhagem L 85 sobre as demais, quando consideradas as médias de todos os tempos conjuntamente (Tabela 7). O desdobramento da análise para cada tempo de cultivo foi apresentado na Tabela 8.

Como para a atividade de PL, os dados de atividade específica de PL em MMTF ajustaram-se a regressões de 4º grau, indicando alterações significativas de desempenho entre todos os tempos de cultivo testados (Tabela 9). O pico de atividade ocorreu a 72 h para as linhagens L 85 e IFO 4626, mas a 96 h para a linhagem M 85 (figura 2B). Padrão de ajustes muito variáveis ocorreram no MMTf, observando-se que para a linhagem IFO 4626 os dados obtidos ajustaram-se a uma regressão linear, sendo coerentemente registrada a maior atividade com 120 h de cultivo. Para a linhagem M 85 houve ajuste a uma regressão de 2º grau, sendo a maior atividade registrada a 96 h. Para a linhagem L 85 houve ajuste dos dados a uma regressão cúbica, com maior atividade registrada a 72 h de cultivo (Tabela 9 e figura 12D).

Conclui-se tanto a partir dos dados de atividade de PL quanto de atividade específica de PL que houve melhoramento genético efetivo do 1º para o 2º ciclos de mutação-seleção (respectivamente linhagens IFO 4626 e M 85) e deste para o 3º ciclo (L 85), posto que se evidenciou como superior a linhagem L 85 (Tabelas 7 e 8) sendo obtidas as maiores médias de atividade e atividade específica de PL em MMTF (Tabela 6) com 72 h de cultivo (figura 12A).

Tabela 8. Teste de Tukey para médias de atividade de PL e atividade específica de PL por linhagem, por tempo e meio de cultivo.

Meio	Tempo	Atividade de PL						Atividade Específica de PL					
		Linhagem	Rep.	Média	5%	1%	Linhagem	Rep.	Média	5%	1%		
MMTF	24h	L 85	3	19,386	a	A	L-85	3	17,810	a	A		
		IFO 4626	3	4,204	b	B	IFO-4626	3	4,297	b	B		
		M 85	3	3,704	b	B	M-85	3	3,046	b	B		
	48h	L 85	3	47,982	a	A	L-85	3	40,546	a	A		
		M 85	3	16,383	b	B	M-85	3	13,434	b	B		
		IFO 4626	3	15,215	b	B	IFO-4626	3	8,329	c	C		
	72h	L 85	3	84,351	a	A	L-85	3	60,262	a	A		
		IFO 4626	3	37,004	b	B		3	22,299	b	B		
		M 85	3	36,136	b	B	M-85	3	21,857	b	B		
	96h	L 85	3	73,473	a	A	L-85	3	54,027	a	A		
		M 85	3	42,643	b	B	M-85	3	30,941	b	B		
		IFO 4626	3	32,432	c	C	IFO-4626	3	22,053	c	C		
	120h	L 85	3	74,908	a	A	L-85	3	54,307	a	A		
		M 85	3	36,970	b	B	M-85	3	28,257	b	B		
		IFO 4626	3	17,718	c	C	IFO-4626	3	11,521	c	C		
MMTf	24h	L 85	3	2,357	a	A	IFO-4626	3	3,034	a	A		
		IFO 4626	3	2,169	a	A	L-85	3	2,745	a	A		
		M 85	3	1,935	a	A	M-85	3	2,003	a	A		
	48h	L 85	3	15,682	a	A	L-85	3	10,264	a	A		
		M 85	3	10,444	b	B	M-85	3	6,791	b	AB		
		IFO 4626	3	7,040	c	B	IFO-4626	3	4,635	b	B		
	72h	L 85	3	13,347	a	A	L-85	3	9,248	a	A		
		M 85	3	10,744	a	AB	M-85	3	7,600	ab	AB		
		IFO 4626	3	7,508	b	B	IFO-4626	3	4,915	b	B		
	96h	L 85	3	11,211	a	A	L-85	3	8,758	a	A		
		IFO 4626	3	10,334	a	A	M-85	3	7,099	a	A		
		M 85	3	9,276	a	A	IFO-4626	3	6,777	a	A		
	120h	IFO 4626	3	9,943	a	A	L-85	3	8,892	a	A		
		L 85	3	9,843	a	A	IFO-4626	3	6,845	a	A		
		M 85	3	9,009	a	A	M-85	3	6,833	a	A		

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO

D.M.S. 5% = 2,90

D.M.S. 1% = 3,66

D.M.S. 1% = 3,66

D.M.S. 1% = 3,56

Tabela 9. Efeito do tempo de cultivo em MMTF e MMTf sobre a atividade de PL (A) e atividade específica de PL (B) em linhagens de *P. chrysogenum* – Regressão Polinomial.

A. Atividade de PL

Meio	Linhagem	Regressão (Prob > F)	Equação	R ² (%)
MMTF	IFO 4626	0,00001	$y = 94,460 - 7,683x + 0,209x^2 - 0,002x^3 + 0,000007x^4$	1,00
	M 85	0,00426	$y = 39,809 - 3,323x + 0,096x^2 - 0,0009x^3 + 0,000003x^4$	1,00
	L 85	0,00001	$y = 168,165 - 13,444x + 0,392x^2 - 0,004x^3 + 0,00001x^4$	1,00
MMTf	IFO 4626	0,01256	$y = -2,342 + 0,225x - 0,001x^2$	0,95
	M 85	0,00128	$y = -18,444 + 1,170x - 0,015x^2 + 0,00006x^3$	0,99
	L 85	0,03291	$y = -58,393 + 4,106x - 0,080x^2 + 0,0007x^3 - 0,000002x^4$	1,00

B. Atividade Específica de PL

Meio	Linhagem	Regressão (Prob > F)	Equação	R ² (%)
MMTF	IFO 4626	0,00035	$y = 62,449 - 4,737x + 0,122x^2 - 0,001x^3 + 0,000003x^4$	1,00
	M 85	0,03245	$y = -26,990 + 2,063x - 0,044x^2 + 0,0005x^3 - 0,000002x^4$	1,00
	L 85	0,00001	$y = 70,384 - 5,425x + 0,177x^2 - 0,002x^3 + 0,000007x^4$	1,00
MMTf	IFO 4626	0,00074	$y = -2,312 + 0,041x$	0,93
	M 85	0,00082	$y = -2,634 + 0,245x - 0,002x^2$	0,91
	L 85	0,03291	$y = -15,201 + 1,050x - 0,014x^2 + 0,00006x^3$	0,97

Figura 12- Cinética da Atividade de PL (A e C) e Atividade específica de PL (B e D) em MMTf (A e B) e MMTf (C e D);

4.4.3.2- Avaliação da Produção de Poligalacturonase (PG) Através da Cinética de Crescimento.

Todos os fatores testados (meio, linhagem e tempo), bem como suas interações apresentaram-se altamente significativos tanto para atividade de PG, quanto para a atividade específica de PG (Tabela 10).

Tabela 10- Efeitos de meio, linhagem e tempo de tratamento sobre a atividade de PG e atividade específica de PG – Análise de Variância.

Causas de Variação	GL	Atividade de PG ($\mu\text{Mol de ác. Galact. mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$)		Atividade específica de PG ($\mu\text{Mol de ác. Galact. mL}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)	
		QM	Prob. >F	QM	Prob. >F
Meio	1	2,419	0,00001	1,066	0,00001
Linhagem	2	0,075	0,00001	0,079	0,00001
Tempo	4	1,532	0,00001	0,546	0,00001
Meio * Linhagem	2	0,059	0,00001	0,058	0,00001
Meio * Tempo	4	0,290	0,00001	0,149	0,00001
Linhagem * Tempo	8	0,043	0,00001	0,035	0,00001
Meio*Tempo*Linhagem	8	0,055	0,00001	0,049	0,00001
Resíduo	60	0,0007		0,0007	
Total	89				
		Média= 0,584 CV=4,42%		Média= 0,420 CV=6,48%	

Para a linhagem IFO 4626, quanto à atividade de PG não houve diferença de efeito entre os meios testados com 24 h de tratamento. Entretanto, nos demais tempos testados (48, 72, 96 e 120h) evidenciou-se superioridade do MMTF. O mesmo foi obtido para a linhagem M 85. Já na linhagem L 85, constatou-se superioridade do MMTF de 24 a 96 h de cultivo, mas não a 120 h (Tabela 11).

Quanto à atividade específica de PG, a linhagem IFO 4626, apresentou desempenho diferente entre os meios testados com 24 h de tratamento, sendo superior a atividade específica no cultivo em MMTf. Entretanto, nos tempos 48, 72 e 96 h evidenciou-se como superior o MMTF. A 120 h não houve diferença

significativa entre os meios de cultivo. Padrão semelhante foi obtido para a linhagem M-85, exceto que a 120 h o desempenho no MMTF mostrou-se significativamente superior. Já na linhagem L 85, não se constatou superioridade do MMTF a 24, mas sim em todos os outros tempos de cultivo estudados, 48, 72, 96 e 120 h (Tabela 11).

Consideradas as médias de todos os tempos testados conjuntamente no MMTF o desempenho das linhagens quanto à atividade de PG diferiu significativamente, sendo superior o da linhagem M 85, seguida pelas demais, que não diferiram entre si. No MMTf, não houve diferença significativa de desempenho entre as linhagens (Tabela 12).

Analisando-se conjuntamente as médias de atividade específica de PG, de todos os tempos testados, no MMTF o desempenho das linhagens quanto à atividade de PG diferiu significativamente, sendo superior o da linhagem M 85, seguida pela L 85 e IFO 4626; no MMTf, entretanto, não houve diferença significativa entre as linhagens (Tabela 12).

Tabela 11- Teste de Tukey para médias de atividade de PG e atividade específica de PG por meio, tempo de cultivo e linhagem.

Linhagem	Tempo de cultivo	Meio	Nº Rep.	Atividade de PG (μMol de ác. Galact. $\text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)			Meio	Nº Rep.	Atividade específica de PG (μMol de ác. Galact. $\text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)		
				Média	5%	1%			Média	5%	1%
IFO 4626	24h	MMTf	3	0,146	a	A	MMTf	3	0,205	a	A
		MMTF	3	0,128	a	A	MMTF	3	0,131	b	B
	48h	MMTF	3	0,916	a	A	MMTF	3	0,500	a	A
		MMTf	3	0,632	b	B	MMTf	3	0,416	b	B
	72h	MMTF	3	1,165	a	A	MMTF	3	0,702	a	A
		MMTf	3	0,582	b	B	MMTf	3	0,380	b	B
	96h	MMTF	3	0,764	a	A	MMTF	3	0,518	a	A
		MMTf	3	0,396	b	B	MMTf	3	0,259	b	B
	120h	MMTF	3	0,435	a	A	MMTF	3	0,283	a	A
		MMTf	3	0,354	b	B	MMTf	3	0,244	a	A
M 85	24h	MMTf	3	0,137	a	A	MMTf	3	0,142	a	A
		MMTF	3	0,107	a	A	MMTF	3	0,088	b	B
	48h	MMTF	3	0,871	a	A	MMTF	3	0,714	a	A
		MMTf	3	0,591	b	B	MMTf	3	0,384	b	B
	72h	MMTF	3	1,298	a	A	MMTF	3	0,786	a	A
		MMTf	3	0,534	b	B	MMTf	3	0,378	b	B
	96h	MMTF	3	1,143	a	A	MMTF	3	0,827	a	A
		MMTf	3	0,439	b	B	MMTf	3	0,336	b	B
	120h	MMTF	3	0,861	a	A	MMTf	3	0,660	a	A
		MMTf	3	0,436	b	B	MMTF	3	0,331	b	B
L 85	24h	MMTf	3	0,186	a	A	MMTF	3	0,171	a	A
		MMTF	3	0,121	b	B	MMTf	3	0,149	a	A
	48h	MMTF	3	1,128	a	A	MMTF	3	0,952	a	A
		MMTf	3	0,514	b	B	MMTf	3	0,337	b	B
	72h	MMTF	3	1,208	a	A	MMTF	3	0,864	a	A
		MMTf	3	0,527	b	B	MMTf	3	0,364	b	B
	96h	MMTF	3	0,601	a	A	MMTF	3	0,442	a	A
		MMTf	3	0,493	b	B	MMTf	3	0,385	b	B
	120h	MMTF	3	0,408	a	A	MMTF	3	0,359	a	A
		MMTf	3	0,397	a	A	MMTf	3	0,296	b	B

MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA INDICADO

D.M.S. 5% = 0,042	D.M.S. 5% = 0,024
D.M.S. 1% = 0,056	D.M.S. 1% = 0,030

Tabela 12- Teste de Tukey para médias de atividade de PG e atividade específica de PG por linhagem e meio de cultivo.

Meio	Linhagem	Atividade de PG ($\mu\text{Mol de } \text{ác. Galact. mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)					Atividade específica de PG ($\mu\text{Mol de } \text{ác. Galact. mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)				
		Nº Rep.	Média	5%	1%		Linhagem	Nº Rep.	Média	5%	1%
MMTF	M 85	15	0,856	a	A		M-85	15	0,615	a	A
	L 85	15	0,706	b	B		L-85	15	0,545	b	B
	IFO 4626	15	0,682	c	B		IFO-4626	15	0,427	c	C
MMTf	M 85	15	0,427	a	A		L-85	15	0,319	a	A
	IFO 4626	15	0,422	a	A		M-85	15	0,314	a	A
	L 85	15	0,410	a	A		IFO-4626	15	0,301	a	A
MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO											
D.M.S. 5% = 0,023						D.M.S. 5% = 0,024					
D.M.S. 1% = 0,029						D.M.S. 1% = 0,030					

No MMTF, com 24 h de cultivo, a L 85 foi superior às demais, que não diferiram entre si a 5% de probabilidade; a 1% a IFO 4626, intermediária, não diferindo dos extremos, que diferiram entre si. A 48 h, a 5 e 1% de probabilidade, a L 85 foi superior às demais, que não diferiram entre si. Com 72 h, a M 85 passou a ser superior, sendo que não diferiram entre si as linhagens L 85 e IFO 4626. Com 96 h, houve diferenças significativas entre as 3 linhagens em estudo, sendo superior a M-85, seguida pela IFO 4626 e L 85, mas a 120 h, novamente a M 85 foi superior às demais, que não diferiram entre si. Ou seja, a L 85 teve maior produção nos tempos de cultivo 24 e 48 h, já a M 85 foi superior com 72, 96 e 120 h de cultivo, no MMTF (Tabela 13).

No MMTF, com 24 h de cultivo, a L 85 foi superior e a M 85 inferior, a IFO 4625 foi intermediária e não diferiu de cada um dos extremos. A 48 h, houve diferenças significativas entre todas as linhagens, sendo superior a L 85, seguida pela M 85 e pela IFO 4626. Com 72 h, a M 85 passou a ser superior, seguida pela L 85 e IFO 4626. Com 96 h, também houve diferenças significativas entre as 3 linhagens em estudo, sendo superior a M 85, seguida pela IFO 4626 e L 85, mas a 120 h, novamente a M 85 foi superior às demais,

que não diferiram entre si a 5% de probabilidade, sendo que a 1% a intermediária, IFO 4626 não diferi dos extremos. Desta forma, também para atividade específica de PG, a L 85 teve maior produção nos tempos de cultivo 24 e 48 h, já a M 85 foi superior com 72, 96 e 120 h de cultivo, no MMTF (Tabela 13).

No MMTf, não houve diferenças significativas entre as linhagens com 24 h de cultivo. A 48 h a L 85 foi inferior às demais, que não diferiram entre si. A 72 h, a IFO 4626 foi superior e a L 85, inferior, a M 85, intermediária, não diferiu significativamente de cada um das outras a 5% de probabilidade, a 1%, o desempenho entre as linhagens não diferiu significativamente. A 96h, a L 85 apresentou-se significativamente superior às demais, que não diferiram entre si. Com 120h, a M 85 foi superior e a IFO 4626 inferior, sendo a L 85 intermediária, não diferindo significativamente das demais.

No MMTf, para atividade específica de PG, com 24 h de cultivo, a linhagem IFO 4626 foi superior e não houve diferenças significativas entre as demais; a 1%, o desempenho das linhagens não diferiu entre si. A 48 h a IFO 4626 foi superior e a L 85 inferior, a M 85 não diferiu dos extremos. A 72 h, as linhagens não diferiram significativamente entre si. Tanto a 96 como a 120 h de cultivo, as linhagens L 85 e M 85 não diferiram entre si, sendo superiores à IFO 4626 apresentou-se significativamente superior às demais, que não diferiram entre si a 5% de probabilidade; a 1% a intermediária não diferiu dos extremos, mas estes diferiram entre si. Com 120h, a M 85 foi superior e a IFO 4626 inferior, sendo a L 85 intermediária, não diferindo significativamente das demais.

Constatou-se alterações significativas no desempenho da linhagem IFO 4626, entre todos os tempos testados, uma vez que houve ajuste significativo dos dados a uma regressão de 4º grau (Tabela 14). Conforme mostrado na figura 1A, evidenciou-se um pico significativo de atividade de PG da linhagem IFO 4626 em MMTF a 72 h de cultivo. A linhagem M 85, cultivada em MMTF também apresentou alterações significativas de desempenho entre todos os

tempos testados com ajuste a uma regressão de 4º grau (Tabela 14). Para essa linhagem também houve um pico de atividade a 72 h de cultivo (figura 13A). Padrão de desempenho semelhante foi observado para a L 85, com ajuste dos dados a uma regressão de grau 4 (Tabela 14). Também essa última linhagem apresentou um pico de atividade a 72 h de cultivo em MMTF (figura 13A).

Quanto à atividade específica de PG, constatou-se alterações significativas no desempenho da linhagem IFO 4626, entre todos os tempos testados, uma vez que houve ajuste significativo dos dados a uma regressão de 4º grau (Tabela 14). Conforme mostrado na figura 1C, evidenciou-se um pico significativo de atividade de PG da linhagem IFO 4626 em MMTF a 72 h de cultivo. A linhagem M 85, cultivada em MMTF também apresentou alterações significativas de desempenho entre todos os tempos testados com ajuste a uma regressão de 4º grau (Tabela 14). Para essa linhagem houve um pico de atividade a 96 h de cultivo (figura 13C). As médias obtidas na L 85, ajustaram-se a uma regressão de 3º grau (Tabela 14). O pico de atividade observado ocorreu a 48 h de cultivo (figura 13C).

A linhagem IFO 4626 cultivada em MMTf apresentou médias de atividade de PG que se ajustaram a uma regressão cúbica (Tabela 14). Conforme apresentado na figura 1C, houve um pico de atividade com 48 h de cultivo, não sendo significativa a diferença de atividade observada entre 96 e 120 h de cultivo. Cultivada em MMTf, a linhagem M-85 apresentou médias de atividade de PG que se ajustaram a uma regressão de 4º grau, havendo portanto, diferenças significativas de atividade entre todos os tempos estudados (Tabela 14). No tempo de cultivo de 48 h, houve um pico de atividade, sendo que a pequena diferença observada entre as atividade a 96 e 120 h é estatisticamente significante. A linhagem L 85 cultivada em MMTf também apresentou médias de atividade de PG que se ajustaram a uma regressão de 4º grau (Tabela 14) e como mostrado na figura 13C, caracterizou-se um pico de atividade a 72 h. Cabe acrescentar que nesse meio de cultura (MMTf) não houve diferenças significativas de atividades entre as linhagens, consideradas as médias de

todos os tempos conjuntamente (Tabela 12). O desdobramento da análise para cada tempo de cultivo foi apresentado na Tabela 13.

Tabela 13- Teste de Tukey para médias de atividade de PG e atividades específica de PG por linhagem, por tempo e meio de cultivo.

Meio	Tempo de cultivo	Atividade de PG ($\mu\text{Mol de ác. Galact. mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$)					Atividade específica de PG ($\mu\text{Mol de ác. Galact. mL}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$)				
		Linhagem	Nº Rep.	Média	5%	1%	Linhagem	Nº Rep.	Média	5%	1%
MMTF	24h	L 85	3	0,186	a	A	L-85	3	0,171	a	A
		IFO 4626	3	0,128	b	AB	IFO-4626	3	0,131	ab	AB
		M 85	3	0,107	b	B	M-85	3	0,088	b	B
	48h	L 85	3	1,128	a	A	L-85	3	0,952	a	A
		IFO 4626	3	0,916	b	B	M-85	3	0,714	b	B
		M 85	3	0,871	b	B	IFO-4626	3	0,500	c	C
	72h	M 85	3	1,298	a	A	M-85	3	0,864	a	A
		L 85	3	1,208	b	B	L-85	3	0,786	b	B
		IFO 4626	3	1,165	b	B	IFO-4626	3	0,702	c	C
	96h	M 85	3	1,143	a	A	M-85	3	0,828	a	A
		IFO 4626	3	0,764	b	AB	IFO-4626	3	0,518	b	B
		L 85	3	0,601	c	C	L-85	3	0,442	c	C
	120h	M 85	3	0,861	a	A	M-85	3	0,660	a	A
		IFO 4626	3	0,435	b	AB	L-85	3	0,296	b	B
		L 85	3	0,408	b	B	IFO-4626	3	0,283	b	B
MMTf	24h	IFO 4626	3	0,146	a	A	IFO-4626	3	0,205	a	A
		L 85	3	0,137	a	A	L-85	3	0,149	b	A
		M 85	3	0,121	a	A	M-85	3	0,142	b	A
	48h	IFO 4626	3	0,632	a	A	IFO-4626	3	0,416	a	A
		M 85	3	0,591	a	A	M-85	3	0,384	ab	AB
		L 85	3	0,514	b	B	L-85	3	0,337	b	B
	72h	IFO 4626	3	0,582	a	A	IFO-4626	3	0,380	a	A
		M 85	3	0,534	ab	A	M-85	3	0,378	a	A
		L 85	3	0,527	b	A	L-85	3	0,364	a	A
	96h	L 85	3	0,493	a	A	L-85	3	0,385	a	A
		M 85	3	0,439	b	AB	M-85	3	0,336	a	A
		IFO 4626	3	0,396	b	B	IFO-4626	3	0,259	..b	B
	120h	M 85	3	0,436	a	A	L-85	3	0,359	a	A
		L 85	3	0,397	ab	AB	M-85	3	0,331	a	A
		IFO 4626	3	0,354	b	B	IFO-4626	3	0,244	..b	B

MEDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NIVEL DE SIGNIFICANCIA INDICADO

D.M.S. 5% = 0,051 D.M.S. 5% = 0,053

D.M.S. 1% = 0,064 D.M.S. 1% = 0,067

Tabela 14- Efeito de linhagem e meio de cultivo sobre a atividade de PG (A) e atividade específica de PG (B) em linhagens de *P. chrysogenum* – Regressão Polinomial.

A. Atividade de PG

Meio	Linhagem	Regressão (Prob > F)	Equação	R ² (%)
MMTF	IFO 4626	0,00001	$y = -0,256 - 0,014x + 0,002x^2 - 0,0003x^3 + 0,0000001x^4$	1,00
	M 85	0,00002	$y = -0,044 - 0,027x + 0,002x^2 - 0,00002x^3 + 0,00000009x^4$	1,00
	L 85	0,00001	$y = -0,867 + 0,026x + 0,001x^2 - 0,0003x^3 + 0,0000001x^4$	1,00
MMTf	IFO 4626	0,00001	$y = -1,180 + 0,078x - 0,001x^2 - 0,000004x^3$	0,99
	M 85	0,00759	$y = -1,646 + 0,117x - 0,002x^2 + 0,00002x^3 - 0,00000004x^4$	1,00
	L 85	0,00705	$y = -1,333 + 0,096x - 0,002x^2 + 0,00001x^3 - 0,00000004x^4$	1,00

B. Atividade Específica de PG

Meio	Linhagem	Regressão (Prob > F)	Equação	R ² (%)
MMTF	IFO 4626	0,00025	$y = -0,364 - 0,039x + 0,002x^2 - 0,00002x^3 + 0,00000007x^4$	1,00
	M 85	0,00001	$y = -2,313 + 0,161x - 0,003x^2 + 0,00003x^3 - 0,00000009x^4$	1,00
	L 85	0,00001	$y = -2,075 + 0,132x - 0,002x^2 + 0,000007x^3$	0,99
MMTf	IFO 4626	0,00001	$y = -0,436 - 0,038x - 0,0005x^2 + 0,000002x^3$	0,99
	M 85	0,00001	$y = -0,448 + 0,034x - 0,0004x^2 + 0,000002x^3$	0,99
	L 85	0,0254	$y = -0,196 + 0,019x - 0,0002x^2 + 0,0000007x^3$	0,99

A linhagem IFO-4626 cultivada em MMTf apresentou médias de atividade de PG que se ajustaram a uma regressão cúbica (Tabela 14). Conforme apresentado na figura 13D, houve um pico de atividade com 48 h de cultivo. Cultivada em MMTf, a linhagem M 85 também apresentou médias de atividade de PG que se ajustaram a uma regressão de 3º grau (Tabela 14). No tempo de cultivo de 48 h, houve um pico de atividade. Como as anteriores, a linhagem L-85 cultivada em MMTf também apresentou médias de atividade de PG que se ajustaram a uma regressão de 3º grau (Tabela 14) e como mostrado na figura 13D, caracterizou-se um pico de atividade a 72 h. No MMTf não houve diferenças significativas de atividades entre as linhagens, consideradas as médias de todos os tempos conjuntamente (Tabela 12). O desdobramento da análise para cada tempo de cultivo foi apresentado na Tabela 13.

Conclui-se portanto que para a atividade de PG houve ganho do 1º ciclo de mutação-seleção, mas não o 2º para o 3º, uma vez que o conjunto de

análises discutidas acima, evidenciou como superior a linhagem M 85 (Tabela 12) sendo obtidas as maiores médias de atividade em MMTF (Tabela 11) com 72 h de cultivo (figura 13C). Para a atividade específica de PG também houve ganho no 1º ciclo de mutação-seleção, mas não no 2º para o 3º, já que o conjunto de avaliações discutidas acima, evidenciou como superior a linhagem M 85 (Tabela 12) sendo obtidas as maiores médias de atividade em MMTF (Tabela 11) tanto com 72 como 96 h de cultivo, tempos relativos aos picos de atividade respectivamente no MMTF e MMTf (figuras 13C e 13D). Ressalta-se que apesar dos ciclos de melhoramento terem sido conduzidos visando elevação da atividade de PL, não houve perda da atividade de PG, ocorrendo inclusive ganho dessa atividade.

Figura 13 - Cinética da Atividade de PG (A e C) e Atividade específica de PG (B e D) em MMTF (A e B) e MMTf (C e D);

legendas: ◊ IFO 4626 □ M 85 △ L 85

5- CONCLUSÃO

- Os valores de índice enzimático no meio sólido e os de atividade enzimática obtidos em filtrados de cultura diferiram amplamente como indicadores do ganho relativo de atividade dos mutantes quando comparados à linhagem que lhes deu origem, mantendo-se constante, entretanto, a indicação da superioridade dos melhores produtores.
- No MMTF foram obtidas as melhores atividades de PL e de PG.
- A linhagem L 85 foi superior, sendo a mais indicada para a continuidade do melhoramento genético ou emprego industrial.
- Quanto à atividade máxima de PL, a da L 85 (72 h) foi de 229,0 % em relação à IFO-4626 (72 h) e de 197,8 % em relação à M 85 (96 h); a da M 85 em relação à IFO-4626, foi de 115,3 %, em MMTF.
- Quanto à atividade específica máxima de PL, a da L 85 (72 h) foi de 270,2 % em relação à IFO-4626 (72 h) e de 197,8 % em relação à M 85 (96 h), a da M 85 em relação à IFO-4626, foi de 138,7 %, em MMTF.
- Quanto à atividade máxima de PG, a da L 85 (72 h) foi de 103,4 % em relação à IFO-4626 (72 h) e de 93,1 % em relação à M 85 (72 h), a atividade da M 85 em relação à da IFO-4626 foi de 111,1 %, em MMTF;

havendo portanto redução da atividade de PG do 1º para o 2º ciclo de mutação-seleção.

- Quanto à atividade específica máxima de PG, a da L 85 (48 h) foi de 136,6 % em relação à IFO-4626 (72 h) e de 115,7 % em relação à M 85 (96 h), a da M 85 em relação à IFO-4626 foi de 118,3 %, em MMTF, evidenciando-se a superioridade da L 85 não apenas em termos de atividade específica máxima de PG, mas também em termos de redução no tempo para atingi-la.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERSHEIM, P. Pectin lyase from fungi. In: NEUFELD, E. F. & GINSBURG, V. eds. **Methods in Enzym.**, New York, Academic Press, v.8, p.628-635, 1966.
- ALBERSHEIM, P., KILLIAS, U. Studies relating to the purification and proprieties of pectin transeliminase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.97, p.107-115, 1962.
- AMARAL, D., COSTA, S. O. P., SCHWAB, A, OLIVEIRA, E. N. S., BRANCO, C. L., CURY, A., TRAVASSOS, L. R. Experimentos de Microbiologia Geral. 3. Ed. Curitiba, MEC/Universidade Federal do Paraná, 170 p. 1967.
- AUNSTRUP, K. Production, isolation and economics of extracellular enzymes. In: WINGARD, L., KATZIR, E.K., GOLDSTEIN, L., (ed.). **Applied Biochemistry and Bioengineering**. New York: Academic Press, v. 2, p. 27-29. 1979.
- AZEVEDO, J. L. Melhoramento genético em microrganismos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.97, n.7, p.1161-8, jul.1986.
- BARACAT, M. C., VALENTIM, C., MUCHOVEJ, J. J. and SILVA, D. O., Selection of Pectinolytic Fungi for Degumming of Natural Fibers. **Biotechnology Letters**, 11 (12), p. 889-902, 1989.
- BARASH, I., ZILBERMAN, E., MARCUS, L. Purification of *Geotrichum candidum* endopolygalacturonase from culture and from host tissue by affinity chromatography on cross-linked polypectate. **Physiol. Plant Pathol.**, v.25, p. 161-169, 1984.

- BECKHORN, E.J. LABEE, M.D., UNDERKUFLER, L. A. Production and use of microbial enzymes for food processing. **J. Agr. Food Chem.** v. 13, n. 1, p. 30, 1965
- BECKHORN, E.J. Production of industrial enzymes. **Wallerstein Labs. Commum.** v. 23, p. 201-211, 1960.
- BEHERE, A., SATYANARAYAN, V., PADWAL-DESAI, S. R. Separation and limited characterization of three polygalacturonases of *Aspergillus niger*. **Enz. Microb. Technol.**, v. 15, p. 158-161, 1993.
- BENATTI, JR. R. Rami: Planta Têxtil e Forrageira, Campinas, **Fundação Cargil**, 97 p., 1985.
- BRUMANO, M. H. N., COELHO, J. L. C., ARAÚJO, E. F., SILVA, D. O. Pectin lyase activity of *Penicillium griseoroseum* related to degumming of ramie. **Rev. Microbiol.**, v. 24, p. 175-178, 1993.
- BURNETT, J. H. Mycogenetics. London. J. Wiley & Sons. 1975. 375 p.
- CHAMIER, A. Cell-wall-degrading enzymes of aquatic hiphomycetes: a review. **Bot. J. Linn. Soc.**, v.91, p. 67-81, 1985.
- CHESSON, A. Maceration in relation to the post-harvest handling and processing of plant material. **J. Appl. Bacteriol.** v. 48, p.1-45, 1980.
- COLLMER, A. & KEEN, N. T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. **Ann. Rev. Phytopathol.**, v. 24, p. 383-409, 1986.
- DEMAIN, A. L. In: JAKOBY W.B. (ed). Enzyme purification and related techniques. **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, v. 22, p. 86-95. 1971.
- DESHPANDE, K. S. & GURUCHARAN, K. Degumming of ramie fibers: role of cell wall degrading enzymes of *Aspergillus versicolor*. **Ind. J. Bot.**, v. 8, p. 79-81, 1985.
- DONAGHY, J. A., LEVETT, P. N. & HAYLOCK, R.W. Changes in microbial populations during anaerobic flax retting. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 9, p. 634-641, 1990.
- EL-REFAI, A.A.; METWALLI, S.M; EL-SEBAIY, L.A. Influence of pH, inoculum concentration, aeration and growth period on production of pectolytic enzymes by *Aspergillus awamori* 16. **Chem. Microbiol. Technol. Lebensm.**, v.8, p. 115-7, 1984.

- ESKIN, N. AM. M.; HENDERSON, H. M.; TOWNSEND, R.S. The biodeterioration of foods. In: **Biochemistry of Foods**. New York, Academic Press, p. 153-215. 1971.
- FAWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Pectolytic moulds in Nigéria. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 15 p. 266-268, 1992.
- FERNANDES-SALOMÃO, T. M., AMORIM, A. C. R., ALVES, V. M. C. Isolation of pectinases hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. *Revista de Microbiologia*, v. 27, p. 15-18, 1996.
- FIEDUREK, J., ILCZUK, Z., LOBARZEWSKI, J. Influence of the mycelium growth conditions on the production of amylolytic and pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger* C. **Acta Biotechnol.**, v.9, p. 355-361, 1989.
- FOGARTY, W.M. & KELLY, C. T. Pectic enzymes. In: FOGARTY, W. M., (ed.) **Microbial enzymes and biotechnology**. London, Applied Science, p. 131-82. 1983.
- FUNGARO, M. H. P., Genética e melhoramento de *Candida sp* para a produção de coalho microbiano. Piracicaba: ESALQ, 119p. Tese (Doutorado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1990.
- GARNIER, C., AXELOS, M. A. V., THIBAUT, J. F. Seletivity and cooperativity in binding of calcium ions by pectins. *Carbohydr. Res.*, v. 256, p. 71-81, 1994.
- GHILDYAL, N. P., RAMAKRISHNA, S. V., DEVI, P. N., LONSANE, B. K., ASTHANA, H. N. Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. **J. Food Sci. Technol.**, v. 18, p. 248-251, 1981.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p. 597-607, 1975.
- JARMAN, C. G., MYKOLUK, S., KENNEDY, L. & CANNING, A. J., Banana fiber: a review of its properties and small-scale extration and processing. **Trop. Science**, 19 (4), p. 173-185, 1977.
- LEUCHTENBERGER, A., MAYER, G. - Changed pectinase synthesis by aggregated mycelium of some *Aspergillus niger* mutants. Central Institute of Nutrition, Bergholz-Rehbrücke, Germany. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 14, January. 1991.

- LEUCHTENBERGER, A.; FRIESE, E.; RUTTLOF, H. Synthesis of variable enzyme spectrum by immobilized mycelium of *A. niger*. **Zeutraibl. Mikrobiol.**, v. 144, p. 139-49, 1989.
- LINEWEAVER, H.; JANSEN, E. F. Pectic enzymes. **Adv. Enzymol.**, v. 11, p. 267-95, 1951.
- McMILLAN, G. P., JOHNSTON, D.J., PEROMBELON, M. C. M. Purification to homogeneity of extracellular polygalacturonase and isoenzymas of pectate lyase of *Erwinia carotovora subsp atroseptica* by column chromatography. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 73, p. 83-86, 1992.
- MEDINA, J. C. Plantas fibrosas da flora mundial. Campinas, **IAC**, p. 437-459. 1959.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analy. Chem.**, v.31, p.426-428, 1959.
- MOLINA, S.M.G.; PELISSARI, F.A.; VITORELLO, C.B.M. Pectinolytic fungi characterization and genetic improvement of *Penicillium chrysogenum* for textile fibers degumming. **Revista Brasileira de Microbiologia** - Journal of the Brazilian Society for Microbiology. São Paulo, SP, Brasil. 10p. (in press).
- PARK, Y. K., FUJUKI, E., LIMA, D. C. Produção de enzimas Pectinolíticas por fungos. I. Isolamento de microrganismos do solo e atividade das enzimas na clarificação de sucos de várias frutas. **Rev. Bras. Tec.**, v. 3, p. 197-203, 1972.
- PARK, Y. K., Produção de enzimas. In: LIMA, V. A, AQUARONE, E., BORZANI, W. (coord.) . **Tecnologia das fermentações**. Ed. São Paulo, v. 3, p. 182-211, 1986.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J. A.; HEMMONS, L. M.; McDONALD, K. F.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in genetics**, New York, v. 5, p. 141-8, 1953.
- REXOVÁ-BENKOVÁ, L., MARKOVIC, O. Pectic enzymes. In IPSON, R. S. & HORTON, D., eds. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**, New York, Academic Press, v. 33, p. 323-385, 1976.

- ROMBOUTS, F. M. & PILNIK, W. Pectic enzymes. In: ROSE, A. HÁ. (ed) **Economic microbiology: microbial enzymes and bioconversions**, London, Academic Press, v. 5, p. 227-282, 1980.
- ROMBOUTS, F. M. & PILNIK, W. Pectinases and other cell-wall degrading enzymes of industrial importance. **Symbiosis**, v.2, p.79-90, 1986.
- ROSEMBERG, J. A. Microbiologia têxtil. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U. A. **Tópicos de Microbiologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, v. 2, p. 97-112, 1975.
- SAID, S., FONSECA, M.J.V. and SIÉSSERE, V., Pectinase production by *Penicillium frequentans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.7, p. 607-608, 1991.
- SAKAI, T., SAKAMOTO, T., HALLAERT, J., VANDAMME, E. J. Pectin, pectinase, and protopectinase: Production, properties and applications. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 39, p. 213-294, 1993.
- SHARMA, H. S. S. Screening of polysaccharide-degrading enzyme for retting flax stem. **Int. Biodeter.**, v.23, p. 1981-1986, 1987.
- SHARMA, H.S.S. - Use of Chelating Compounds as Treatment for Removing Residual Non-Cellulosic Polysaccharides Present on Flax Fibre. **Cellulose Chemistry and Technology**, 23 (5), 1989.
- SIÉSSERE, V., SAID, S. Pectic enzymes production in solid state fermentation using citrus pulp pellets by *Talaromyces flavus*, *Tubercularia vulgaris* and *Penicillium charlessi*. **Biotechnol. Lett.**, v. 11, n. 5, p. 343-344, 1989.
- SOLLER, M. Optimisation of recurrent selection under mutagenesis in microorganisms. **The genetical society of Great Britain**, v.44, p. 295-214. 1980.
- STARR, M. P. & CHATTERJEE, A. K. The Genus *Erwinia*: Enterobacteria pathogenic to plants and animals. **Ann. Review Microbiol.**, 26: 389-426, 1972.
- TALMADGE, K. W., KEEGSTRA, K., BAUER, W. D., ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. 1. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cell with a detailed analysis of the pectic polysaccharides. **Plant Physiol.**, v. 51, p. 158-173, 1973.

- TANAKA, Y.; MURATA, N.; KATO, K. Behavior of nuclei and chromosomes during ascus development in the mating between either rice-strain or weeping lasegrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. **Annual Phytopathology Society Japan, Tokio**, 45: 182-91, 1979.
- THIBAUT, J. F. & MERCIER, C. *Aspergillus niger* endopolygalacturonase. II. Characterization and some properties. **J. of Food Biochem.**, 2: 379-93, 1978.
- TSUYUMU, S. & MIYAMOTO, Y. Effective production of bacterial pectinases. **Symbiosis**, v.2, p.103-109, 1986.
- UEDA, S.; FUJIO, Y.; LIM, J. Y. Production and some properties pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A3. **J. Appl. Biochem.**, v. 4, p.524-32, 1982.
- WALLERSTEIN, L. U.S. Pat. 995820 and 995823-6, 1911
- WEINSCHUTZ, R.; KAMINSKI, M. ; CORREA, J. B. C. Esterification of citrus pectin with ethylene oxide: kinetic parameter. **Ci. Cult.**, v. 45, p. 19-21, 1993.
- WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**, New York: Marcel Dekker, p. 291-349p. 1972.
- WHITAKER, J.R., Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enz. Microbiol. Technol.**, v. 6, p. 341-349, 1984.
- YOSHITAKE, S., NUMATA, T., KATSURAGI, T., HOURS, R. A., SAKAI, T. Purification and characterization of a pectin-releasing enzyme produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. **J. Ferm. Bioeng.**, v. 77, p. 370-375, 1994.