OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO
E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS DE
PENICILLIUM FREQUENTANS

VALÉRIA SIÉSSERE

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.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1991

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO
E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS DE
PENICILLIUM FREQUENTANS

VALÉRIA SIÉSSERE
Bióloga

Orientadora: Prof.^a Dr.^a SURAIA SAID

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.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Siéssere, Valéria

S573o Otimização das condições de cultivo para produção e
 caracterização parcial das enzimas pectinolíticas de
 Penicillium frequentans. Piracicaba, 1991.
 120p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Enzima microbiana 2. Pectinase - Caracterização
3. Pectinase - Produção I. Escola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", Piracicaba.

CDD 576.11925

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO
E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS PECTINOLITICAS DE
PENICILLIUM FREQUENTANS

VALÉRIA SIÉSSERE

Aprovada em: 23.05.1991

Comissão julgadora:

Prof.^a Dr.^a Suraia Said

FCFRP/USP

Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho

ESALQ/USP

Prof.^a Dr.^a Maria José Vieira Fonseca

FCFRP/USP

Prof.^a Dr.^a SURAIA SAID
Orientadora

"Durante a vida, nenhum ato,
nenhuma palavra são indiferentes.
Tudo deixa um rastro,
transformando-se em semente. É
como uma pedra que atiras na água:
de círculo em círculo, o movimento
atingirá a margem distante."

(Yvone Tual)

Aos meus pais

por terem proporcionado o
início desse caminho e pelo
exemplo de confiança e
respeito que aprendi a
cultivar.

AGRADECIMENTOS

Meu profundo reconhecimento a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Em especial:

A Profa Dra Suraia Said, pelo estímulo, apoio e orientação que vem oferecendo, contribuindo assim para a realização do presente trabalho. O meu crescimento, enquanto pesquisadora, foi facilitado pela confiança que depositou em mim.

A Profa Dra Maria José Vieira Fonseca, pela assessoria na elaboração deste trabalho, cuja presença amiga se fez marcante pelo espírito científico, disponibilidade e dedicação.

Aos funcionários Maria Angélica dos Santos Cunha Chellegatti e André Luiz Ignácio, que participaram diretamente da realização deste trabalho e que através de sua cooperação e amizade possibilitaram concluí-lo.

Ao Célio Kenji Miyasaka e Ana Amélia Carraro, pelo estímulo e convivência nos momentos difíceis, pelo companheirismo, afeto e compreensão com que compartilharam da minha trajetória de vida.

Aos docentes do curso de mestrado em Microbiologia Agrícola da ESALQ (USP), pela oportunidade de um convívio enriquecedor.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto (USP), em particular ao Departamento de
Ciências Farmacêuticas, onde foi desenvolvido este
trabalho.

A todas as pessoas nas quais encontrei
solidariedade e afeto.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

SUMARIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
SUMMARY.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Substrato: Polissacarídeos pécticos.....	3
2.2. Enzimas pectinolíticas.....	5
2.3. Produção de enzimas pectinolíticas por fungos.....	10
2.4. Purificação das enzimas pectinolíticas produzidas por fungos.....	15
2.5. Modo de ação das enzimas pectinolíticas.....	18
2.6. Aplicações das enzimas pectinolíticas.....	22
2.7. Papel das enzimas pectinolíticas na patogênese vegetal.....	26
2.8. Características do fungo <i>Penicillium frequentans</i> ..	28
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1. Microrganismo.....	31
3.2. Manutenção da cepa no laboratório e obtenção de esporos.....	31
3.3. Obtenção das enzimas pectinolíticas.....	32
3.3.1. Meio de cultivo.....	32

3.3.2. Inóculo do meio de cultivo.....	33
3.3.3. Condições de cultivo.....	34
3.3.4. Recuperação das enzimas.....	34
3.4. Determinação do crescimento micelial.....	35
3.5. Avaliações das atividades enzimáticas.....	35
3.5.1. Método viscosimétrico.....	36
3.5.2. Quantificação dos grupos redutores liberados.....	37
3.6. Modificações nas condições de obtenção das enzimas pectinolíticas para otimização da produção.....	39
3.7. Estudo dos mecanismos regulatórios.....	40
3.7.1. Determinação dos substratos indutores.....	40
3.7.2. Efeito de glicose.....	41
3.8. Caracterização do complexo pectinolítico.....	41
3.8.1. Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas pectinolíticas.....	41
3.8.2. Efeito do pH sobre a atividade das enzimas pectinolíticas.....	42
3.8.3. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas.....	42
3.8.4. Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas.....	43
3.9. Separação das enzimas pectinolíticas.....	43
3.9.1. Cromatografia em coluna de DEAE-Sephacel...	43
3.9.2. Cromatografia em coluna de CM-Celulose.....	44

3.10. Métodos analíticos utilizados durante os processos cromatográficos.....	45
3.10.1. Atividade diminuidora da viscosidade.....	45
3.10.2. Atividade liberadora de açúcar redutor...	46
3.10.3. Atividade de pectinesterase.....	47
3.10.4. Atividade liase.....	49
3.10.5. Determinação de proteínas.....	50
3.11. Caracterização parcial das enzimas pectinolíticas.....	50
3.11.1. Estudos sobre o modo de ação das enzimas pectinolíticas sobre o substrato.....	51
3.11.1.1. Viscosidade relativa e clivagem das ligações glicosídicas.....	51
3.11.1.2. Análise cromatográfica dos produtos de reação enzimática..	52
3.11.2. Estudo sobre a especificidade das enzimas pectinolíticas quanto ao substrato.....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
PARTE I - DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS.....	55
4.1. Efeito da concentração de pectina no meio de cultivo.....	55
4.2. Efeito do pH inicial do meio de cultivo.....	57
4.3. Efeito da idade das culturas utilizadas no inóculo.....	60
4.4. Efeito da concentração do inóculo.....	60

4.5. Efeito da temperatura	63
4.6. Determinação do tempo de produção das enzimas pectinolíticas nas condições ideais de cultivo....	65
PARTE II - ESTUDO DOS MECANISMOS REGULATORIOS.....	69
4.7. Determinação dos substratos indutores.....	69
4.8. Efeito de glicose.....	72
PARTE III - CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO PECTINOLITICO...	75
4.9. Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas pectinolíticas.....	75
4.10. Efeito do pH sobre a atividade das enzimas pectinolíticas.....	77
4.11. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas.....	79
4.12. Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas.....	82
PARTE IV - SEPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS PECTINOLITICAS.....	84
4.13. Cromatografia das enzimas pectinolíticas do filtrado da cultura em coluna de DEAE-Sephacel...	84
4.14. Cromatografia do pico I em coluna de CM-Celulose.....	89
4.15. Determinação do modo de ação das enzimas dos picos enzimáticos sobre o substrato polipeptato de sódio: determinação do caráter endo ou exo....	96
4.16. Estudo sobre a especificidade das enzimas dos picos enzimáticos quanto ao substrato.....	100

5. CONCLUSIONES.....	103
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	106
APENDICE.....	119

LISTA DE FIGURAS

	Página
Esquema 1. Modo de ação das enzimas pectinolíticas.....	6
Figura 1. Curva de tempo de produção das enzimas pectinolíticas nas condições estabelecidas.....	67
Figura 2. Efeito de glicose sobre a síntese e secreção das enzimas pectinolíticas.....	73
Figura 3. Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas pectinolíticas.....	76
Figura 4. Efeito do pH sobre a atividade das enzimas pectinolíticas.....	78
Figura 5. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas.....	80
Figura 6. Cromatografia da mistura enzimática produzida por <i>Penicillium frequentans</i> em coluna de DEAE-Sephacel.....	85
Figura 7. Cromatografia do pico I em coluna de CM-Celulose.....	91
Figura 8. Determinação do caráter endo ou exo dos picos enzimáticos separados pelo processo cromatográfico.....	97
Figura 9. Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise do polipectato de sódio.....	99
Figura 10. Especificidade dos picos enzimáticos quanto ao substrato.....	101

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Efeito da concentração de pectina sobre a produção de enzimas pectinolíticas.....	56
Tabela 2. Efeito do pH inicial do meio de cultivo sobre a produção de enzimas pectinolíticas.....	58
Tabela 3. Efeito da idade das culturas utilizadas no inóculo sobre a produção de enzimas pectinolíticas.....	61
Tabela 4. Efeito da concentração do inóculo sobre a produção de enzimas pectinolíticas.....	61
Tabela 5. Efeito da temperatura sobre a produção de enzimas pectinolíticas.....	63
Tabela 6. Efeito de diferentes substratos sobre a síntese das enzimas pectinolíticas.....	71
Tabela 7. Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas.....	83
Tabela 8. Sumário do processo de separação das enzimas pectinolíticas do filtrado da cultura de <i>Penicillium frequentans</i> em coluna de DEAE-Sephacel.....	88
Tabela 9. Sumário do processo de separação das enzimas pectinolíticas do pico I em coluna de CM-Celulose.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

CM - Carboximetil

DEAE - Dietilaminoetil

DNS - Acido 3,5 - dinitrosalicílico

D.O. - Densidade óptica

EDTA - Acido etilenodiaminotetraacético

NaPP - Polipectato de sódio

SDS - Dodecil sulfato de sódio

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS DE
Penicillium frequentans.

Autora: VALÉRIA SIÉSSERE

Orientadora: Profa Dra SURAIA SAID

RESUMO

O complexo pectinolítico é composto por enzimas que degradam substâncias pécticas. Vários microrganismos produzem essas enzimas, mas para fins industriais, principalmente na clarificação de sucos de frutas, somente as de origem fúngica são utilizadas.

Os objetivos deste estudo foram adequar as condições de cultivo para produção de enzimas pectinolíticas por *Penicillium frequentans*, e caracterizá-las parcialmente. A atividade pectinolítica presente nos filtrados das culturas foi avaliada, principalmente, por diminuição da viscosidade e por liberação de açúcar redutor de uma solução contendo como substrato, pectina ou ácido poligalacturônico.

A melhor concentração de pectina para induzir a síntese do complexo pectinolítico era 0,5% e com

valores maiores observou-se uma redução nos níveis enzimáticos, provavelmente devido à repressão catabólica. O pH inicial do meio de cultivo também influenciou a produção de enzimas pectinolíticas por este microrganismo. Nos intervalos de pH 2,0 - 2,5 e 7,0 - 8,0 obteve-se os maiores níveis enzimáticos, mas enquanto no primeiro detectou-se atividade diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor, no segundo havia também a atividade de pectina liase. A concentração de inóculo mais adequada para produção de enzimas pectinolíticas em 20 horas de incubação era 5.10^7 esporos/ml de meio de cultivo. Esporos obtidos de culturas com 10 dias apresentaram melhores resultados, e a melhor temperatura era 30 - 35°C. Combinando-se todas essas condições, ajustando o pH inicial em 2,5 e mantendo-se a cultura sob agitação constante, detectou-se que os níveis enzimáticos aumentaram até a 17ª hora de cultivo. Quando a cultura era mantida sem agitação, os maiores níveis enzimáticos foram obtidos na 48ª hora. As enzimas produzidas em cultura agitada mostraram-se bastante resistentes ao pH (2,6 - 8,2) e à temperatura (40°C). Determinou-se que as condições ótimas de reação eram em pH 2,6 a 6,0 e nas temperaturas entre 50 e 55°C, quando o substrato era pectina.

Os melhores indutores das enzimas pectinolíticas produzidas por *Penicillium frequentans* foram pectina cítrica, ácido poligalacturônico, "citrus pulp

pellets" e ácido monogalacturônico, nesta ordem. Observou-se também que a presença de glicose em concentrações iguais ou superiores a 0,8%, produzia o "efeito glicose", provavelmente por repressão catabólica.

As enzimas pectinolíticas assim produzidas foram separadas e parcialmente caracterizadas quanto ao seu mecanismo de ação e substrato preferido. Através de cromatografia de troca iônica em colunas de DEAE-Sephacel e CM-Celulose separou-se seis picos enzimáticos com atividade depolimerizante, três dos quais apresentaram atividade do tipo endo e os outros restantes apresentaram caráter exo. Polipectato de sódio era o substrato preferido para as enzimas de todos os picos. Atividade pectinesterase foi detectada nas frações mas não foi adequadamente separada por esse processo cromatográfico. Esses resultados permitem-nos concluir que o fungo *Penicillium frequentans* produz, nas condições estabelecidas, pelo menos três endopoligalacturonases, três exopoligalacturonases e pectinesterase.

OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS FOR PRODUCTION AND
PARCIAL CHARACTERIZATION OF *Penicillium frequentans*
PECTINOLYTIC ENZYMES

Author: VALÉRIA SIÉSSERE

Adviser: Profa Dra SURAIA SAID

SUMMARY

The pectinolytic complex is composed by enzymes which degrade pectic substances. Several microorganisms produce these enzymes, but to industrial purposes, mainly in fruit juice clarification, only the fungi enzymes are used.

The objectives of this study were to make suitable the culture conditions for pectinolytic enzymes production by *Penicillium frequentans* and to characterize partially them. The pectinolytic activity present in culture filtrate was mainly measured by viscosity-diminishing activity and reducing sugar-releasing activity with pectin or polygalacturonic acid solutions as substrates.

The best pectin concentration to induce pectinolytic complex synthesis was 0,5% and at higher

values it was found enzymatic levels reduction, likely due to catabolic repression. Initial pH of the culture medium also influenced the pectinolytic enzymes production by this microorganism. The highest enzymatic levels were obtained at two different range of pH (2,0 - 2,5 and 7,0 - 8,0), as measured by viscosity-diminishing activity and reducing sugar-releasing activity. In the second range, there was also found the pectin lyase activity. Suitable inoculum concentration for pectinolytic enzymes production, for 20 hours incubation, was $5 \cdot 10^7$ spores/ml of the culture medium. Spores derived from 10 days old cultures presented the best results and the ideal temperature was 30 - 35°C. Using the determined conditions, the fungus was grown in a medium with the pH 2,5 and keeping constant agitation. By this way, the enzymatic levels increased until the 17^a hour of culture. In absense of agitation, this increase was observed only at the 48^a hour. Enzymes produced in agitated cultures showed resistance to pH (2,6 - 8,2) and to temperature (40°). Ideal reaction conditions were at pH 2,6 - 6,0 and temperature between 50 and 55°C, when substrate was pectin.

In order of effectiveness, the best inducers of pectinolytic enzymes produced by *Penicillium frequentans* were citric pectin, polygalacturonic acid, citrus pulp pellets and monogalacturonic acid. The "glucose effect" was

verified when the glucose concentrations was 0,8% or more, likely by catabolic repression.

The pectinolytic enzymes produced in this way were separated and partially characterized by their action mechanism and preferred substrate. Six enzymatic peaks with depolymerizing activity were separated by ion-exchange chromatography using DEAE-Sephacel and CM-Celulose columns. Three of them presented endo activity and the others had exo character. The sodium polypectate was found to be the preferred substrate for all the separated enzymes. The pectinesterase activity was observed in fractions but wasn't suitably shared by this separation process. These results show us that *Penicillium frequentans* was able to produce, at least three endopolygalacturonase, three exopolygalacturonase and pectinesterase enzymes, in our established conditions.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas pectinolíticas são produzidas pelas plantas e microrganismos, principalmente bactérias e fungos filamentosos, e alguns protozoários e leveduras.

Os estudos realizados com microrganismos produtores de enzimas pectinolíticas visam, geralmente, sua produção e caracterização para fins industriais, ou a identificação das enzimas envolvidas na fitopatogenicidade, procurando inativá-las ou reprimir sua síntese.

A importância comercial das enzimas pectinolíticas decorre, principalmente, de sua utilização na indústria de sucos de frutas. Para se obter concentrados de alta qualidade, é essencial degradar a pectina e clarificar o suco, o que é realizado principalmente com enzimas de origem fúngica.

Atualmente em alguns países, pensa-se na possibilidade da indústria cítrica produzir enzimas pectinolíticas por fermentação dos subprodutos da extração do suco, os quais são ricos em substâncias pécticas.

Utilizando o fungo filamentoso *Penicillium frequentans*, o presente estudo tem como principais objetivos :

1. Estabelecer as condições ideais de cultivo para a síntese e secreção de enzimas pectinolíticas, em cultura submersa .
2. Investigar a capacidade deste fungo utilizar resíduos da indústria cítrica, como substrato, para a produção das enzimas em estudo.
3. Estudar os mecanismos regulatórios de indução e repressão da síntese das enzimas pectinolíticas.
4. Separar e caracterizar parcialmente as enzimas pectinolíticas produzidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Substrato: Polissacarídeos pécticos

Os carboidratos representam uma parte significativa da matéria sólida dos vegetais, apresentando-se sob a forma de açúcares simples e polissacarídeos (amido, celulose, hemicelulose e materiais pécticos).

As substâncias pécticas são polissacarídeos estruturais que ocorrem em todos os tecidos de vegetais superiores. São encontradas em quantidades variáveis, na lamela média e parede primária das células, não excedendo 1% do peso fresco. A degradação da pectina da lamela média resulta na desintegração do tecido pela separação das células, processo denominado maceração (FOGART & KELLY, 1983).

Quimicamente, as substâncias pécticas são heteropolissacarídeos com peso molecular de 30.000 a 300.000, que consistem de uma cadeia principal de ácido α -D-galacturônico parcialmente esterificado com metanol. Quando todos os grupos carboxílicos do ácido poligalacturônico estão esterificados, o conteúdo metoxil é

de 16,32%, isto é, o grau de esterificação é 100%. Alguns açúcares podem interromper a cadeia galacturônica ou estar ligados à cadeia principal através de ligações laterais, tais como L-ramanose, D-galactose, D-xilose e L-arabinose (ROMBOUTS & PILNIK, 1980; FOGART & KELLY, 1983).

Segundo a "American Chemical Society Committee on Pectin Nomenclature" (1944), as substâncias pécticas são carboidratos coloidais complexos que ocorrem em vegetais, e contém uma grande proporção de unidades de ácido anidrogalacturônico formando cadeias. Os grupos carboxílicos dos ácidos poligalacturônicos podem ser parcialmente esterificados por grupamentos metil e parcialmente ou completamente neutralizados por uma ou mais bases. As substâncias pécticas podem ser assim classificadas:

Protopectina: substância péctica presente nos vegetais, insolúvel em água, e que por hidrólise restrita fornece ácido pectínico ou pectina.

Acido pectínico: ácido poligalacturônico coloidal que contém mais que uma pequena proporção de grupos metil éster. Sob condições adequadas é capaz de formar gel com açúcares e ácidos; mas se o conteúdo metoxil for baixo, a formação de gel ocorre também com certos íons.

Pectina: ácido pectínico, solúvel em água, que apresenta grupamentos metil éster e grau de

neutralização variáveis, e é capaz de formar gel com açúcares e ácidos, sob condições adequadas.

Ácido péctico (ou ácido poligalacturônico): substância péctica composta principalmente de ácido poligalacturônico coloidal livre de grupos metil éster. (Mc CREADY, 1970; FOGART & KELLY, 1983).

2.2. 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 pectinolíticas são produzidas por plantas e microrganismos e não são sintetizadas por células animais, exceto por alguns insetos (*Pyrrhocoris apterus*) (ROMBOUTS & PILNIK, 1972; FOGART & KELLY, 1983).

Pectinase é o termo utilizado para designar a mistura de enzimas pécticas (ou pectinolíticas), como foi recomendado pelo "Committee on Pectin Nomenclature" em 1926 (LINEWEAVER & JANSEN, 1951). A classificação das enzimas pectinolíticas está baseada na sua ação sobre a estrutura poligalacturônica da molécula do substrato. De acordo com o modo de ação dessas enzimas, ROMBOUTS & PILNIK (1980) e FOGART & KELLY (1983) dividiram-nas em enzimas desesterificantes e depolimerizantes (Esquema 1).

Segundo ROMBOUTS & PILNIK (1980), a pectinesterase (PE) é a enzima desesterificante que catalisa a hidrólise de ligações éster das substâncias pécticas liberando metanol e ácido péctico ou pectínico.

Ainda segundo os autores, as depolimerases podem ser caracterizadas levando-se em consideração o substrato preferido (pectina, ácido péctico ou oligo-D-galacturonatos), o tipo de clivagem (hidrólise ou trans-eliminação) e a atuação sobre a molécula do substrato, isto é, por clivagem de ligações glicosídicas ao acaso no interior da molécula (endo atividade) ou por clivagem de ligações terminais (exo atividade).

As hidrolases atuam rompendo as ligações glicosídicas entre as unidades galacturônicas pela entrada de uma molécula de água e podem ser classificadas em:

Poligalacturonase (PG): Enzima que catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas entre os resíduos galacturônicos desesterificados das substâncias pécticas. Pode ser uma endopoligalacturonase (endo-PG) ou uma exopoligalacturonase (exo-PG), conforme o modo de ação sobre o substrato, e ambas são hidrolases cujo substrato preferido é o pectato. A endopoligalacturonase hidrolisa as ligações glicosídicas ao acaso, produzindo uma série de oligogalacturonatos e acumulando preferencialmente monogalacturonato, digalacturonato e trigalacturonato; sua atividade decresce com o aumento do grau de esterificação

do substrato. A exopoligalacturonase libera galacturonato por clivagem terminal do pectato.

Polimetilgalacturonase (PMG): Hidrolase cujo substrato preferido é a pectina. No entanto, a existência dessa enzima é ainda controvertida, pois há a possibilidade de preparações impuras de poligalacturonase contendo pectinesterase terem sido consideradas como polimetilgalacturonase.

Oligogalacturonase (OG): Enzima que degrada substratos de cadeia curta, ligada às células.

As liases atuam por trans-eliminação, formando dupla ligação entre o C-4 e C-5 na molécula do substrato. As liases podem ser classificadas em:

Poligalacturonato liase (PGL) ou pectato liase: Apresenta atividade endo ou exo. A primeira tem como substratos preferidos o pectato e a pectina com baixo metoxil, e degrada os substratos ao acaso, produzindo uma série de oligogalacturonatos insaturados e acumulando dímeros e trímeros. A exopoligalacturonato liase libera dímeros insaturados da molécula de pectato, e assim como a exopoligalacturonase, prefere substratos de alto peso molecular ou é indiferente para com o comprimento da cadeia dos substratos.

Endopolimetilgalacturonato liase (endo-PMGL) ou pectina liase: É a única depolimerase específica para pectina com alto metoxil (FOGART & KELLY, 1983)..

Esquema 1. Modo de ação das enzimas pectinolíticas: polimetilgalacturonase (PMG), polimetilgalacturonato liase (PMGL), pectinesterase (PE), poligalacturonase (PG) e poligalacturonato liase (PGL).

Oligogalacturonato liase (OGL): Enzima que degrada preferencialmente substratos de cadeia curta, removendo monômeros insaturados por processo trans-eliminativo. Essa enzima, assim como a oligogalacturonase, parece ser importante no catabolismo de galacturonatos pelos microrganismos.

Além das enzimas já citadas, alguns autores demonstraram a existência de protopectinase, enzima que faz a conversão da protopectina em um produto solúvel. Essa atividade poderia também ser realizada pela ação combinada de endopoligalacturonase com pectinesterase, ou mesmo pela ação de enzimas que hidrolisam outros polissacarídeos ligados às substâncias pécticas no tecido da planta (DEUEL & STUTZ, 1958). Enzimas que solubilizam protopectina foram isoladas por SAKAI & TAKAOKA (1985), que observaram nas mesmas, atividade endopoligalacturonase. No entanto, alguns microrganismos que produziam esse tipo de enzima não eram capazes de assimilar ácido poligalacturônico, sugerindo a existência de dois tipos de endopoligalacturonase; uma com atividade protopectinase junto com a atividade de degradação do ácido poligalacturônico, portanto, capaz de macerar os tecidos vegetais, e a outra, somente com atividade de degradação das substâncias pécticas, formando ácido monogalacturônico.

As substâncias associadas com os resíduos galacturonatos das substâncias pécticas podem também

fornecer sítios de ação de outras enzimas, além das já citadas, mas a existência dessas enzimas não foi comprovada (LINEWEAVER & JANSEN, 1951).

Um resumo da classificação das enzimas pectinolíticas, segundo FOGART & KELLY (1983), é apresentado no APENDICE.

2.3. Produção de enzimas pectinolíticas por fungos

A principal razão para o interesse em utilizar microrganismos como fontes potenciais de enzimas é a facilidade com que os níveis enzimáticos podem ser aumentados por manipulações genéticas ou alterações nas condições de cultivo. Alguns fatores considerados importantes na produção de enzimas são: a linhagem microbiana, temperatura, pH, transferência de oxigênio, composição do meio, velocidade de crescimento, indução, repressão "feedback", repressão catabólica e manipulação genética (DEMAIN, 1972).

Um dos fatores que influenciam a produção de enzimas pectinolíticas é o substrato e a concentração deste no meio de cultivo. LARIOS *et alii* (1989) verificaram que o crescimento de *Aspergillus sp.* em meio de cultivo contendo 2% de casca de limão não tratada, como substrato, resultou numa produção de endopoligalacturonase quatro vezes superior àquela obtida na presença de 2% de pectina. A

produção de exopoligalacturonase, no entanto, foi similar nas duas condições, sugerindo que a primeira enzima é mais sensível à repressão catabólica exercida pelos produtos da degradação da pectina, os quais se acumulam em curtos períodos de tempo. Observaram também, que a maior produção enzimática foi obtida quando o meio de cultivo foi suplementado com 3% do resíduo utilizado. PETRUCCIOLI *et alii* (1989) também verificaram que o aumento na concentração do substrato (resíduo da casca de laranja) de 3,0 para 4,5% provocou uma diminuição no rendimento da enzima produzida por *Aureobasidium pullulans*, provavelmente devido à repressão da síntese pela presença de açúcares simples prontamente utilizáveis.

Alguns microrganismos são cultivados em resíduos orgânicos ou subprodutos industriais ricos em substâncias pécticas tais como: resíduos da indústria de extração de azeite de oliva, bagaço de maçã, resíduos sólidos da indústria cítrica, farelo de trigo e outros, com a finalidade de produção de pectinase (NISHIO & NAGAI, 1979; MALDONADO *et alii*, 1986; FEDERICI *et alii*, 1988; HOURS *et alii*, 1988a; HOURS *et alii*, 1988b; SIÉSSERE & SAID, 1989; FONSECA *et alii*, 1991).

Estudando o efeito de diferentes substâncias pécticas, combinadas com diferentes valores de pH, PERLEY & PAGE (1971) verificaram que as enzimas pectinolíticas produzidas por uma linhagem de *Fusarium roseum* foram

diferentemente induzidas em pH 3,5 e 6,5 utilizando-se soluções contendo substâncias pécticas específicas. Em pH 3,5 , pectina 1% induziu as enzimas endopoligalacturonase e pectinesterase, enquanto em pH 6,5 , induziu a síntese de endopolimetilgalacturonase e endopolimetilgalacturonato liase. Acido poligalacturônico 1% ou ácido múcico 0,02 M também induziram endopoligalacturonase, porém em pH 6,5.

MANACHINI *et alii* (1988) verificaram que *Aureobasidium pullulans* LV 10 produziu pectina hidrolase (polimetilgalacturonase) em todas as culturas contendo substâncias pécticas e as liases foram produzidas, em níveis apreciáveis, somente em meio de cultivo contendo pectina com alto metoxil. Maior produção de hidrolases foi verificada quando o pH do meio era 4,5 , enquanto que para liases, o valor de pH era de 6,5 ou maior que este. Pectinesterase foi produzida em níveis reduzidos e durante a purificação foi perdida. Vários outros autores demonstraram que a maior produção de poligalacturonase ocorre em pH ácido, geralmente em torno de 3,0 - 4,0 (LARIOS *et alii*, 1989; PETRUCCIOLI *et alii*, 1989; BAILEY & PESSA, 1990).

A temperatura ótima de crescimento e produção de atividade pectinolítica depende do microrganismo utilizado. LARIOS *et alii* (1989) trabalhando com *Aspergillus sp.* verificaram que maior crescimento e produção de atividade pectinolítica ocorreu quando as

culturas eram incubadas a 37°C; PETRUCCIOLI *et alii* (1989), obtiveram maior produção dessas enzimas por *Aureobasidium pullulans* quando a temperatura de cultivo era 24°C; e todas as cepas de *Cylindrocarpon destructans*, patogênicas ou não, tiveram a produção de exo e endopolimetilgalacturonase diferentemente afetadas por várias temperaturas e valores de pH (STRZELCZYK *et alii*, 1987).

λ// ↘ MARCUS & SCHEJTER (1983) verificaram que em culturas de 10 dias de *Botrytis cinerea* foram produzidas duas pectinesterases e duas poligalacturonases, e em culturas de 16 dias, produziram em adição às enzimas já citadas, mais duas poligalacturonases, uma pectinesterase e uma pectina liase, mostrando que a idade das culturas é outro fator que influi no número e natureza das enzimas pectinolíticas produzidas.

Estudando os mecanismos regulatórios de *Aspergillus sp.*, AGUILAR & HUITRON (1987) verificaram que adicionando-se ácido galacturônico ou glicose em diferentes tempos de cultivo obtinha-se uma resposta diferencial na produção de atividade pectinolítica quando avaliada pela liberação de grupos redutores e por diminuição da viscosidade. A produção de atividade pectinolítica, avaliada pela liberação de grupos redutores, não foi afetada quando baixas concentrações de glicose ou ácido monogalacturônico foram adicionadas às culturas que estavam crescendo em meio contendo pectina, independente do

tempo de adição. Já a atividade pectinolítica avaliada por diminuição da viscosidade não foi afetada pela adição de glicose na 24ª hora de cultivo, mas foi estimulada pela adição de ácido galacturônico no mesmo período, sugerindo sua participação na indução dessa atividade. No entanto, repressão catabólica foi observada quando esses substratos foram adicionados no início do cultivo. A produção de ambas atividades pectinolíticas foi fortemente reprimida quando glicose foi adicionada em altas concentrações e, menos afetada quando ácido galacturônico foi adicionado nas mesmas concentrações.

A produção de poligalacturonase por um mutante de *Aspergillus niger*, adenina requerente, foi induzida e sujeita à repressão catabólica. Glicose, frutose ou intermediários da glicólise, mas não intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico reprimiram a síntese da enzima. A repressão catabólica por glicose ocorreu rapidamente e quase por completo (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

A síntese das enzimas pectinolíticas por fungos filamentosos é variável qualitativa e quantitativamente dependendo da espécie e das condições de cultivo utilizadas, conseqüentemente, as características bioquímicas das enzimas produzidas também são muito diversas (ROMBOUTS & PILNIK, 1972).

Em *Aspergillus niger* foram encontradas as enzimas exopoligalacturonase e endopoligalacturonase. O pH

ótimo de atividade e de estabilidade encontrado para a primeira enzima foi 5,2 e qualquer alteração no pH resultou na diminuição da atividade específica. Nem o Hg^{+2} ou outros cátions divalentes (Ca^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2}) afetaram a atividade (HEINRICHOVA & REXOVA-BENKOVA, 1976). Para a endopoligalacturonase o pH ótimo foi 4,1 - 4,2, sendo que uma curva similar, com o mesmo pH ótimo, foi encontrada quando o substrato era heptassacarídeos ou pectato de sódio (REXOVA - BENKOVA & MRACKOVA, 1978).

Aureobasidium pullulans LV 10 produziu atividade pectinolítica extracelular quando cresceu em meio contendo pectina de maçã, como fonte de carbono. Após concentração por ultrafiltração, duas hidrolases e duas liases foram parcialmente purificadas em colunas cromatográficas com CM-Sepharose 6B, DEAE-celulose e Sephadex G-100. As hidrolases I e II deram atividade ótima a 50°C em pH 5,5 e 4,5, respectivamente. Para liases I e II, o pH ótimo era 5,0 e 7,5 respectivamente, a 40°C (MANACHINI *et alii*, 1988).

2.4. Purificação das enzimas pectinolíticas produzidas por fungos

Diferentes procedimentos são utilizados na purificação de enzimas, geralmente combinando-se dois ou mais processos de separação, como precipitação com sulfato

de amônio ou etanol seguida de cromatografia de troca iônica e gel filtração. A homogeneidade das preparações enzimáticas assim obtidas é geralmente verificada por eletroforese e focalização isoelétrica. Através desses processos foram purificadas várias enzimas de diferentes fungos. PARINI *et alii* (1988) obtiveram duas pectina liases (L₁ e L₂) de culturas líquidas de *Aureobasidium pullulans* LV 10, parcialmente purificadas por ultrafiltração e cromatografia em colunas de CM-Sepharose 6B e DEAE-Celulose (L₁) ou Sephadex G-100 (L₂). A atividade da L₁ foi aumentada 15 vezes sobre o material original, enquanto a L₂ foi aumentada 13 vezes, com recuperação de 33 e 8,7% da atividade inicial, respectivamente. PRUSKY *et alii* (1989) utilizando os processos de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS) e focalização isoelétrica, purificaram 130 vezes, até homogeneidade aparente, duas isoenzimas de *Colletotrichum gloeosporioides* com atividade poligalacturonase. Foram purificadas também as enzimas: endopoligalacturonase de *Verticillium albo-atrum* (WANG & KEEN, 1970); poligalacturonase de *Penicillium expansum* (CONWAY *et alii*, 1988); endopoligalacturonase e exopoligalacturonase de *Aspergillus niger* (MILL & TUTTOBELLO, 1961; MILL, 1966); endopoligalacturonase de *Rhizopus stolonifer* (MANACHINI *et alii*, 1987); endopoligalacturonase de *Rhizopus arrhizus* (LIU & LUH, 1978); e duas pectina hidrolases

(polimetilgalacturonases) e duas pectina liases de *Aureobasidium pullulans* LV 10 (MANACHINI *et alii*, 1988). Nesses trabalhos, a recuperação da atividade enzimática inicial ficava entre 8,6 e 55% e o índice de purificação da atividade específica era de 35 a 400 vezes.

Alguns autores mostraram que um bom procedimento de purificação de enzimas pectinolíticas tem sido a cromatografia de afinidade com polipectato, que fornece uma boa separação das enzimas num único passo cromatográfico. MARCUS & SCHEJTER (1983) conseguiram separar duas pectinesterases e duas poligalacturonases do fluido da cultura de *Botrytis cinerea* através desse método cromatográfico. O rendimento do processo foi para poligalacturonase I, poligalacturonase II, pectinesterase I e pectinesterase II, respectivamente 5,0 , 3,9 , 9,0 e 6,7%, enquanto o índice de purificação foi de 8,43 , 27,4 , 64,7 e 75,5 vezes. Nenhuma atividade de pectinesterase foi encontrada nas poligalacturonases e atividade liase também estava ausente em todas as frações descritas. BARASH *et alii* (1984) obtiveram uma preparação de endopoligalacturonase homogênea, do filtrado da cultura de *Geotrichum candidum*, também por um único passo cromatográfico em coluna de afinidade com polipectato, com recuperação de 30%. A atividade específica da enzima foi purificada 55 vezes e uma única banda de proteína foi detectada por eletroforese. MARCUS *et alii* (1986) também

purificaram quatro enzimas pectinolíticas de um *Rhizoctonia solani* por cromatografia de afinidade com polipectato. As enzimas, endopoligalacturonase I, endopoligalacturonase II, pectinesterase e endopectinase apresentaram alto grau de pureza, evidenciado pelo aparecimento de uma única banda quando cada uma das 4 enzimas era sujeita a eletroforese em gel SDS.

2.5. Modo de ação das enzimas pectinolíticas

ROMBOUTS & PILNIK (1972) em trabalho de revisão bibliográfica consideram que a clivagem de pequena porcentagem de ligações glicosídicas, com redução de 50% da viscosidade inicial da solução do substrato, é típica de endo enzimas e, clivagem superior a 10% das ligações glicosídicas é indicativa de exo enzimas; porém citam uma endopoligalacturonase de *Aspergillus niger* que proporciona uma redução de 50% da viscosidade com clivagem de 10-15% das ligações glicosídicas. Citam também que alguns autores consideram que se uma redução de 50% da viscosidade da solução do substrato é acompanhada pela clivagem de 2-3% das ligações glicosídicas, pode-se concluir que a enzima é do tipo endo. Por outro lado, uma redução de 50% da viscosidade por uma enzima do tipo exo requer uma clivagem de aproximadamente 20% das ligações glicosídicas do substrato.

Os valores de porcentagem de ligações hidrolisadas, com decréscimo de 50% da viscosidade, encontrados para algumas enzimas com atividade endo são: 0,15% para endopoligalacturonase da levedura *Candida macedoniensis* (CALL *et alii*, 1985); 1,0 - 2,0% para endopoligalacturonase de *Botrytis cinerea* (DI LENNA & FIELDING, 1983); 1,7 , 1,3 e 1,8%, respectivamente para endopoligalacturonase I, endopoligalacturonase II e endopectina liase de *Rhizoctonia solani* (MARCUS *et alii*, 1986); aproximadamente 3% para sete isoenzimas com atividade endopoligalacturonase de *Rhizoctonia solani* (SCALA *et alii*, 1980); 2,39% para endopoligalacturonase de *Rhizopus arrhizus* (LIU & LUH, 1978); e 5% para uma diminuição de 27% da viscosidade causada por uma endopoligalacturonase parcialmente purificada de *Aspergillus niger*.

ROMBOUTS & PILNIK (1972) enfatizam também, que os valores de porcentagem de ligações glicosídicas encontrados dependem muito do grau de polimerização do substrato e do método de análise dos grupos redutores utilizado. Para redução de 50% da viscosidade específica, a porcentagem de ligações glicosídicas clivadas por enzimas que atuam ao acaso é inversamente proporcional ao grau de polimerização do substrato, e como essa propriedade do substrato geralmente não é conhecida, consideram claro que as porcentagens de ligações clivadas não possuem valor

quantitativo. Essa porcentagem é geralmente avaliada por um dos procedimentos padrões para análise de grupos redutores, a maioria dos quais (inclusive o método DNS) tem em comum a oxidação de grupos aldeídos em meio alcalino. Nessas condições, a velocidade de degradação química pode ser maior que a velocidade de oxidação.

[Por cromatografia dos produtos de degradação do substrato, pode-se dizer que uma enzima é do tipo exo se os primeiros produtos a serem liberados são monômeros ou dímeros; no caso de produtos oligoméricos aparecerem primeiro, a enzima tem atividade endo. Nas misturas de reação com endopoligalacturonase I e endopoligalacturonase II de *Rhizoctonia solani*, por exemplo, foram liberados ácidos octo, hepta, hexa, penta, tetra, tri, di e monogalacturônico (MARCUS *et alii*, 1986); para endopoligalacturonase de *Rhizopus arrhizus*, ácidos oligogalacturônicos não foram produzidos até 40 minutos de hidrólise e monômeros foram encontrados no hidrolisado somente após 2 horas de reação (LIU & LUH, 1978); os produtos de hidrólise encontrados pela ação de sete isoenzimas com atividade endopoligalacturonase de *Rhizoctonia solani* foram mono, di e trigalacturonatos (SCALA *et alii*, 1980) e pela ação de uma exopoligalacturonase de extrato micelial de *Aspergillus niger* foi exclusivamente produzido ácido monogalacturônico (MILL, 1966).

No entanto, FOGART & KELLY (1983), citam que os produtos finais da ação de endopoligalacturonase sobre ácido poligalacturônico são geralmente ácidos mono, di e trigalacturônicos e que estes podem ser produzidos ou por um mecanismo de ataque múltiplo em uma única cadeia do substrato (nesse caso aparecendo rapidamente) ou por ataque em múltiplas cadeias do substrato, onde os monômeros, dímeros e trímeros acumulam-se somente após a hidrólise dos oligogalacturonatos maiores (os quais são os produtos iniciais da depolimerização).

Como exemplo do primeiro mecanismo temos a liberação de ácidos mono, di e trigalacturônico nos primeiros estágios de degradação do polipectato de sódio devido à ação de endopoligalacturonase I e endopoligalacturonase II de *Botrytis cinerea*, mas após prolongada degradação, somente ácido monogalacturônico e traços de ácido digalacturônico foram observados (MARCUS & SCHEJTER, 1983).

Alguns fungos produzem enzimas pectinolíticas que atuam exclusivamente sobre um substrato, mas a maioria das enzimas degradam polipectato de sódio e pectina (com graus de esterificação variados), porém com velocidades de reação diferentes. A endopoligalacturonase de *Candida macedoniensis* hidrolisou ácido poligalacturônico em pH 5,0, mas não pectina (CALL *et alii*, 1985); a endopoligalacturonase I e endopoligalacturonase II de

Botrytis cinerea não foram capazes de hidrolisar pectina (MARCUS & SCHEJTER, 1983); endopoligalacturonase I e endopoligalacturonase II de *Rhizoctonia solani* mostraram preferência por ácido poligalacturônico como substrato, quando comparado com pectina, mas a pectina liase produzida pelo mesmo fungo era específica para pectina (MARCUS *et alii*, 1986); a extensão da degradação da pectina avaliada pela liberação de açúcar redutor durante 10 minutos de incubação com endopoligalacturonase de *Penicillium capsulatum* era somente 16% da degradação do ácido poligalacturônico (GILLESPIE *et alii*, 1990) e o complexo pectinolítico (de uma enzima comercial) hidrolisou ácido poligalacturônico numa velocidade inicial dezessete vezes mais rápida do que pectina (JANSEN & MAC DONNEL, 1945).

2.6. Aplicações das enzimas pectinolíticas

Várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são frequentemente utilizadas na produção comercial de enzimas pectinolíticas e estas preparações contém geralmente pectinesterase e poligalacturonase (LINEWEAVER & JANSEN, 1951).

As enzimas pectinolíticas são usadas principalmente nas indústrias de alimentos e dentre estas, é na clarificação de sucos de frutas que encontra maior aplicação (ROMBOUTS & PILNIK, 1980). A produção de suco de

maçã clarificado pelo uso dessas enzimas vem sendo praticada há muitos anos. Mais recentemente, o tratamento enzimático de certos sucos de uva antes da fermentação tem sido descrito. O vinho resultante clarifica mais rapidamente que aqueles feitos a partir de sucos de uva não tratados. Também a adição dessas enzimas a uvas esmagadas resultou num maior rendimento do suco e maior facilidade na prensagem (LINEWEAVER & JANSEN, 1951). O suco de pera também tem sido tratado com pectinase, resultando numa queda rápida da viscosidade e na diminuição da turbidez, formando flocos que sedimentam. Um suco claro é então obtido por filtração ou centrifugação. No caso do suco de maçã, a diminuição da viscosidade pode ser causada pela atividade combinada de pectinesterase e endopoligalacturonase na solução de pectina altamente esterificada. A clarificação é também possível pela atividade da pectina liase (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

A aplicação industrial das enzimas pectinolíticas nos processos de maceração é encontrada na produção de purês e alimentos para bebês, bem como no tratamento preliminar de café e cacau com o propósito de remover a polpa indesejada da fruta (CALL *et alii*, 1985).

A maceração pode ser realizada por uma pectinase relativamente rica em endopoligalacturonase e quase livre de pectinesterase e pectina liase. Esta preparação degrada a pectina da lamela média, que se supõe

ter um baixo grau de esterificação. No entanto, a maceração pode também ser feita com uma pectina liase pura. Se celulase é usada junto com as enzimas pécticas, uma liquefação quase completa dos frutos e vegetais pode ser realizada (ROMBOUTS & PILNIK, 1980). Uma aplicação biotecnológica importante das enzimas macerantes é o isolamento de protoplastos de células vegetais (SREENATH *et alii*, 1986).

As enzimas pectinolíticas são utilizadas também na valorização dos subprodutos da indústria cítrica (polpa lavada) e no isolamento de óleos essenciais e pigmentos carotenóides da casca de *Citrus* (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

As preparações comerciais de enzimas pécticas usadas na indústria de alimentos, geralmente originam-se de fungos, especialmente do *Aspergillus niger*. Tais fontes normalmente contém uma mistura de enzimas pécticas, geralmente associadas com hemicelulases e/ou celulases, utilizadas nos processos que requerem somente um tipo de enzima pectinolítica. É o caso, por exemplo, do uso da endopoligalacturonase na preparação de suco de laranja. Foi mostrado que o suco pode ser estabilizado pelo uso de altos níveis de atividade de poligalacturonase (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

Estudos sobre imobilização de enzimas pectinolíticas (principalmente de endopoligalacturonase)

têm sido realizados visando sua utilização na clarificação de sucos (PIFFERI & PREZIUSO, 1987; STRATILOVA *et alii*, 1987; LOZANO *et alii*, 1988).

Existem limitações legais para a aplicação de enzimas microbiais na tecnologia de alimentos. Somente são aceitas enzimas derivadas de microrganismos envolvidos na fermentação de alimentos tradicionalmente conhecidos. Foi estabelecido que estes microrganismos não são patogênicos ou tóxicos aos seres humanos, sendo então denominados classe GRAS ("generally recognized as safe") (ROMBOUTS & PILNIK, 1986).

Mais recentemente, crescente interesse tem surgido no uso de enzimas para finalidades como preparação de pectina com baixo metoxil, hidrólise de substâncias pécticas a ácido monogalacturônico e análise de material vegetal. A preparação de ácido galacturônico por enzimas pécticas pela hidrólise da pectina tem sido recomendada por impedir a destruição de ácido galacturônico que ocorre com a hidrólise ácida. O ácido galacturônico pode ser usado como matéria-prima na síntese de vitamina C (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

O processo de produção de fibras têxteis a partir do linho, cânhamo e juta está baseado na capacidade de certos microrganismos pectinolíticos liberarem fibras de celulose do caule de plantas fibrosas (ROMBOUTS & PILNIK, 1980; BARACAT *et alii*, 1989).

2.7. Papel das enzimas pectinolíticas na patogênese vegetal

As enzimas pectinolíticas não são as únicas polissacaridases envolvidas na patogênese vegetal, mas são as primeiras a serem produzidas nos tecidos infectados e pelos fungos cultivados sobre paredes celulares isoladas. Isso ocorre devido a susceptibilidade dos polímeros pécticos ao ataque enzimático e à consequente liberação de indutores pécticos; mas logo que outros polissacarídeos tornam-se expostos pela degradação do material péctico, maiores níveis de outras enzimas são produzidos pelo patógeno, incluindo glicosidades, hemicelulases e celulases, que juntamente às enzimas pectinolíticas podem causar uma liquefação quase que completa do material vegetal (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

Embora sintetizadas e exportadas do citoplasma do patógeno para o tecido hospedeiro, as enzimas pectinolíticas não são necessariamente ativas; vários tecidos hospedeiros contêm inibidores ou variam na susceptibilidade à maceração, que é causada pela degradação dos polímeros estruturais da lamela média e parede primária, facilitando a penetração e colonização pelo patógeno. Inibidores foram isolados e parcialmente caracterizados em tecidos ou paredes celulares de feijão, pepino, ervilha, pimenta, tomate, pera, maçã, pêssego e

frutas cítricas. Vários inibidores são glicoproteínas e estão ligados a polissacarídeos, outros estão ligados ionicamente à parede celular, e são facilmente extraídos; no entanto, questiona-se a eficácia *in vivo* de alguns inibidores cujas atividades foram demonstradas *in vitro*. Por outro lado, a inibição das reações de defesa do hospedeiro pode ser realizada por oligogalacturonatos liberados da parede primária (HALL & WOOD, 1973; COLLMER, 1985).

Portanto, pode-se dizer que as enzimas pectinolíticas atuam provavelmente como um componente de um conjunto de fatores que causam doenças em vegetais, e as diferentes enzimas pectinolíticas podem estar envolvidas na patogênese, como a polimetilgalacturonase de *Rhizopus stolonifer* em batata-doce (SPALDING, 1963), poligalacturonase de *Rhizopus stolonifer* em pêssego (NGUYEN-THE *et alii*, 1985), poligalacturonase de *Corticium praticola* em batata (HALL & WOOD, 1973), endopoligalacturonase de *Rhizoctonia solani* em batata (SCALA *et alii*, 1980), endopoligalacturonase de *Botrytis cinerea* em maçã e cenoura (DI LENNA & FIELDING, 1983), endopoligalacturonase de *Pyrenochaeta terrestris* em cebola (KEEN & HORTON, 1966), poligalacturonase e pectinesterase de *Monilinia fructigena* em maçã (BYRDE & WILLETTS, 1977), e endopoligalacturonase de *Aspergillus flavus* em algodão (CLEVELAND & Mc CORMICK, 1987).

2.8. Características do fungo *Penicillium frequentans*

A espécie *Penicillium frequentans* é uma das mais abundantes e largamente distribuídas do gênero *Penicillium*. Normalmente são encontrados no solo e sobre matéria vegetal em decomposição.

As linhagens pertencentes a essa espécie apresentam variações apreciáveis na aparência da colônia. Conforme descrito por RAMIREZ (1982), as colônias crescem rapidamente em meio Czapeck-Agar atingindo um diâmetro de 50 - 60 mm em 14 dias à temperatura ambiente (20 - 25°C) e apresentam zonas de crescimento com área central comumente sulcada. São de aparência aveludada e apresentam forte esporulação (geralmente verde, mas em algumas linhagens torna-se cinza com a idade). O reverso da colônia tem tonalidade que varia de amarelo-laranja a castanho-avermelhado, mas pode ser ligeiramente marron-arroxeadado em algumas linhagens. As estruturas reprodutivas deste fungo apresentam as hastes dos conidióforos curtas, com até 200 µm de comprimento e 3,0 - 3,5 µm de diâmetro, com paredes lisas ou ligeiramente rugosas, alargando-se no ápice numa vesícula de 5,0 µm de diâmetro. Estruturas conidiais são produzidas abundantemente formando uma camada contínua sobre a superfície toda da colônia. Os penicílios são quase sempre únicos, mas às vezes apresentam ramificações. Os esterigmas formam grupos de 10 - 12 ou mais no verticilo, a

maioria com 8 - 12 μm . Geralmente produzem cadeias de conídios em colunas bem definidas de 150 μm ou mais, às vezes quebrando-se com a idade. Os conídios são globosos, com paredes delgadas, lisas ou ligeiramente rugosas e na maioria com 3,0 - 3,5 μm de diâmetro.

Até o momento, nenhuma referência foi encontrada com respeito à produção de enzimas pectinolíticas por *Penicillium frequentans*; sabe-se no entanto, que pode ser utilizado no controle biológico de fungos fitopatogênicos (DE CAL *et alii*, 1988; MELGAREJO *et alii*, 1989).

Uma linhagem de *Penicillium frequentans* encontrada em solos ácidos diferiu das linhagens típicas por desenvolver extenso micélio branco estéril quando cultivado em meio Czapeck-Agar. Essa linhagem produziu uma substância antifúngica e fracamente antibacteriana denominada frequentina. Uma maior produção é conseguida quando o fungo cresce em meio Czapeck-Dox (5% de glicose) por 10 dias a 25°C. A substância ativa pode ser recuperada por extração com solventes orgânicos seguida de cristalização. Foi verificado que a frequentina não contém nitrogênio, enxofre ou halogênio, não deixando cinzas na combustão; e que sua fórmula provável é $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_4$ (CURTIS *et alii*, 1951).

DE CAL *et alii* (1988) e MELGAREJO *et alii* (1989) isolaram e caracterizaram parcialmente duas

substâncias antibióticas (A e B) produzidas por uma cepa de *Penicillium frequentans*. Ambas eram ativas contra a germinação de esporos e crescimento do tubo germinativo de *Monilinia laxa* e de outros fungos fitopatogênicos. Embora ainda não confirmado, há indicações que o antibiótico A trata-se da frequentina citada no trabalho de CURTIS *et alii* (1951).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

O fungo utilizado neste estudo foi isolado do solo em nosso laboratório, identificado por Maria José S. Fernandes (Universidade Federal de Pernambuco) como *Penicillium frequentans* e está depositado na coleção da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" em Campinas (SP). Esse e outros fungos foram submetidos a um processo de seleção quanto à capacidade de sintetizar enzimas pectinolíticas extracelulares em cultura submersa e em meio sólido constituído de resíduos agroindustriais (SIÉSSERE & SAID, 1989).

3.2. Manutenção da cepa no laboratório e obtenção de esporos.

A cultura de *Penicillium frequentans* foi mantida pura através de repicagens sucessivas em meio sólido inclinado ("slants") preparado como segue:

- farinha de aveia.....4,0 g
- ágar-ágar.....1,5 g
- água destilada.....100 ml

A cultura nova foi incubada, durante 5 a 12 dias, em estufa bacteriológica a 30°C e os esporos formados foram utilizados para inocular meios de cultura líquidos, ou conservados sob refrigeração (4°C). Para o primeiro propósito, coletava-se os esporos assepticamente em água destilada estéril raspando-se a superfície da cultura. Com o objetivo de retirar fragmentos de micélios e ágar, essa suspensão foi filtrada através de gaze e a concentração de esporos determinada por contagem em câmara de Neubauer sob microscópio.

3.3. Obtenção das enzimas pectinolíticas

3.3.1. Meio de cultivo

Em todas as culturas vegetativas, empregou-se uma modificação do meio de cultura descrito por MANACHINI *et alii* (1987). A mistura salina foi preparada da seguinte maneira: a 75 ml de água destilada, adicionou-se os sais abaixo relacionados dissolvendo-os um a um.

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$0,09 g
- KH_2PO_40,20 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$0,10 g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,10 g

A mistura salina foi suplementada com uma fonte de carbono (como descrito em cada experimento) e 0,1% (p/v) de extrato de levedura (fonte de vitaminas do complexo B e aminoácidos). O pH foi ajustado em 3,5 com solução de ácido sulfúrico 0,1 N e o volume completado para 100 ml com água destilada. A esterilização foi realizada em autoclave a 120°C por 20 minutos.

A síntese das enzimas pectinolíticas foi induzida suplementando-se a mistura salina descrita com 0,8% (p/v) de pectina cítrica (Sigma) que continha aproximadamente 88% de ácido galacturônico e 8,9% de grupos metoxil.

3.3.2. Inóculo do meio de cultivo

Os meios de cultivo foram inoculados com alíquotas da suspensão de esporos em água, de maneira a se obter $5 \cdot 10^8$ esporos por mililitro de meio.

3.3.3. Condições de cultivo

O cultivo foi realizado inoculando-se esporos de *Penicillium frequentans*, como descrito na seção 3.3.2., em frasco Erlenmeyer contendo 1/5 do seu volume em meio de cultivo.

As culturas foram mantidas a 30°C sob agitação constante (160 ciclos por minuto) ou em condição estacionária em estufa bacteriológica, dependendo do protocolo experimental.

3.3.4. Recuperação das enzimas

Os fluidos das culturas foram separados das células por filtração através de papel de filtro, adaptado a funil de Büchner acoplado a uma bomba à vácuo.

Para eliminar interferentes nas análises enzimáticas, o filtrado da cultura foi dialisado contra tampão citrato de sódio 10 mM, pH 4,8, por 24 horas sob refrigeração, com três trocas do tampão (diluição aproximada de 15.000 vezes). As análises das atividades enzimáticas extracelulares foram realizadas imediatamente após a diálise.

3.4. Determinação do crescimento micelial

O crescimento das culturas foi avaliado pelo peso seco da biomassa. A massa micelial foi separada por filtração à vácuo, lavada com água destilada e seca em estufa a 70°C até atingir peso constante.

3.5. Avaliações das atividades enzimáticas

Por tratar-se de uma mistura de enzimas pectinolíticas, a atividade enzimática extracelular foi avaliada como:

A) Atividade diminuidora da viscosidade:
corresponde principalmente à atividade das enzimas pectinolíticas que clivam ligações glicosídicas ao acaso, no interior da molécula do substrato, causando uma diminuição da viscosidade relativa da solução do mesmo.

B) Atividade liberadora de açúcar redutor:
corresponde principalmente à atividade das enzimas pectinolíticas que clivam ligações glicosídicas a partir de uma das extremidades da molécula do substrato, liberando açúcar redutor.

3.5.1. Método viscosimétrico

A atividade diminuidora da viscosidade foi avaliada pelo método modificado de MILL & TUTTOBELLO (1961). A mistura de reação continha:

- 5,5 ml de uma solução de pectina cítrica 0,5% (p/v) em tampão acetato de sódio 25 mM, pH 4,0 contendo 0,1 M de NaCl

- 0,5 ml do filtrado da cultura dialisado (volume máximo)

O tubo contendo a mistura de reação foi incubado a 50°C por 10 minutos e interrompeu-se a reação enzimática resfriando-a rapidamente em banho de gelo. Considerou-se 100% de viscosidade àquela obtida por uma mistura que continha solução de substrato e água, em idênticos volumes aos da mistura de reação.

A diminuição da viscosidade relativa da solução do substrato foi estimada pela redução no tempo de escoamento de 1 ml da mistura de reação em viscosímetro (tipo Ostwald), acoplado a um banho de água circulante termostatizado a 30°C. O tempo de escoamento de 1 ml de água destilada era 25 segundos.

A porcentagem de redução da viscosidade foi calculada, segundo MILL & TUTTOBELLO (1961), pela seguinte expressão:

Redução da viscosidade (%) = $(V_i - V_r / V_i - V_a) \cdot 100$;

onde:

V_i = tempo de escoamento do controle

V_r = tempo de escoamento da solução do substrato após
a reação enzimática

V_a = tempo de escoamento da água

Uma unidade viscosimétrica (UV) foi definida como a quantidade de enzima necessária para diminuir em 50% a viscosidade inicial da solução do substrato em um minuto de reação, nas condições acima definidas (SCALA *et alii*, 1980; MANACHINI *et alii*, 1987). A atividade diminuidora da viscosidade foi expressa em UV/ml de meio de cultivo.

3.5.2. Quantificação dos grupos redutores liberados

Os grupos redutores liberados da solução do substrato foram avaliados pela modificação do método do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959).

O reagente ácido dinitrosalicílico foi preparado da seguinte maneira: a 100 ml de água destilada adicionou-se as substâncias na ordem relacionada, dissolvendo-as uma a uma.

- ácido 3,5-dinitrosalicílico.....0,7486 g
- hidróxido de sódio.....1,3983 g
- tartarato de sódio e potássio.....21,6100 g
- metabissulfito de sódio.....0,5862 g
- fenol (aquecido a 50°C).....0,54 ml

A mistura de reação continha:

- 0,25 ml da solução de pectina cítrica 0,5% (p/v) em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8

- 0,25 ml da mistura enzimática adequadamente diluída, se necessário

A reação enzimática foi realizada a 50°C durante 30 minutos e interrompida com a adição de 1,5 ml de reagente DNS seguida de imediata agitação. A seguir, o desenvolvimento de coloração foi realizado em banho-maria fervente, por 5 minutos, e após o resfriamento à temperatura ambiente, diluiu-se o conteúdo do tubo com 8 ml de água destilada. A densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro a 575 nm e os valores obtidos foram comparados com curva padrão de ácido monogalacturônico. Uma unidade de atividade enzimática (U) é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de ácido monogalacturônico por minuto de reação, nas condições descritas. A atividade liberadora de açúcar redutor foi expressa em U/ml de meio de cultivo.

3.6. Modificações nas condições de obtenção das enzimas pectinolíticas para otimização da produção

Para aumentar a produção de enzimas pectinolíticas, alterou-se cada uma das condições citadas anteriormente na seção 3.3., conforme descrito a seguir, mantendo-se as demais constantes.

A) O efeito da concentração do substrato indutor sobre a síntese e secreção das enzimas pectinolíticas foi investigado suplementando-se o meio de cultivo com 0,3 , 0,5 , 0,8 , 1,0 e 1,5% (p/v) de pectina.

B) O efeito do pH sobre a produção de atividade pectinolítica, foi verificado ajustando o pH inicial do meio de cultivo, no intervalo de 2,0 a 8,0 , pela adição de solução de ácido sulfúrico ou hidróxido de potássio 0,1 N, antes da esterilização.

C) Com o objetivo de investigar se havia relação entre a produção de enzimas pectinolíticas e a idade das culturas, inoculou-se os meios de cultivo com esporos oriundos de culturas com 5, 7, 10 e 12 dias.

D) O efeito da concentração do inóculo foi investigado utilizando-se $5 \cdot 10^5$, $5 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^7$ e $1 \cdot 10^8$ esporos/ml de meio cultivo.

E) O efeito da temperatura na produção de atividade pectinolítica foi determinado pela incubação das culturas nas temperaturas de 25, 30, 35 e 40°C.

F) Para determinar o tempo necessário à obtenção dos maiores níveis de enzimas pectinolíticas, o fungo *Penicillium frequentans* foi incubado, com e sem agitação, nas condições de cultivo estabelecidas nas seções 4.1., 4.2., 4.3., 4.4. e 4.5.

3.7. Estudo dos mecanismos regulatórios

3.7.1. Determinação dos substratos indutores

Diferentes fontes de carbono foram adicionadas ao meio de cultivo, na concentração final de 0,5% (p/v), com o objetivo de investigar os substratos capazes de induzir a síntese e secreção de enzimas pectinolíticas por *Penicillium frequentans*, cultivado sob agitação nas condições descritas na seção 3.6.F.

Foram utilizados individualmente: ácido monogalacturônico, glicose, arabinose, frutose, galactose, manose, sorbose, xilose (monossacarídeos); celobiose, sacarose, lactose, maltose, trealose (dissacarídeos); ácido poligalacturônico, celulose, pectina (polissacarídeos); manitol e "citrus pulp pellets" (resíduo da indústria cítrica).

3.7.2. Efeito de glicose

O efeito de glicose sobre a síntese e secreção de enzimas pectinolíticas por *Penicillium frequentans* foi estudado pela adição, no tempo zero de incubação, de glicose 0,8 , 1,6 ou 2,4% (p/v), ao meio de cultivo que continha também 0,8% de pectina. O inóculo foi realizado com massa micelial obtida de pré-crescimento por 24 horas, em meio de cultivo suplementado com 2,4% de glicose como única fonte de carbono, e as culturas foram mantidas sob agitação, por 24 horas, a 30°C.

3.8. Caracterização do complexo pectinolítico

Com o objetivo de caracterizar o complexo pectinolítico produzido por *Penicillium frequentans*, determinou-se os efeitos da temperatura e do pH na atividade e estabilidade das enzimas pectinolíticas, presentes nos filtrados das culturas desenvolvidas nas condições ideais de cultivo (seção 4 - parte I).

3.8.1. Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas pectinolíticas

As misturas de reação, preparadas como descrito na seção 3.5. , foram incubadas em várias

temperaturas no intervalo de 30 a 70°C durante 10 ou 30 minutos, respectivamente para determinação das atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor.

3.8.2. Efeito do pH sobre a atividade das enzimas pectinolíticas

Para determinação do pH ótimo das enzimas pectinolíticas produzidas por *Penicillium frequentans*, a solução do substrato (pectina) foi preparada em tampão ácido cítrico - fosfato dissódico 25 mM, com valores de pH no intervalo de 2,6 a 8,2. A amostra enzimática foi dialisada contra água destilada e utilizada na mistura de reação, de acordo com a metodologia descrita na seção 3.5.

3.8.3. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas

O estudo da termoestabilidade das enzimas pectinolíticas em tampão citrato de sódio 10 mM, pH 4,8 foi realizado incubando-se a amostra enzimática nas temperaturas de 40, 50, 60 ou 70°C, por no máximo 120 minutos, seguida da avaliação da atividade enzimática residual, conforme descrito na seção 3.5.

3.8.4. Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas

O efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas foi investigado pela adição de tampão ácido cítrico - fosfato dissódico 50 mM, ajustado em pH 2,6 a 8,2 , às amostras enzimáticas (dialisadas contra água destilada), na proporção de 1:1. A mistura enzima-tampão permaneceu à temperatura ambiente (25°C) por 30 minutos e a reação enzimática foi iniciada pela adição da solução do substrato, segundo as condições descritas na seção 3.5.

3.9. Separação das enzimas pectinolíticas

As enzimas pectinolíticas secretadas por *Penicillium frequentans*, nas condições ideais de cultivo (seção 4 - parte I), foram separadas por cromatografia em colunas de DEAE-Sephacel e CM-Celulose.

3.9.1. Cromatografia em coluna de DEAE-Sephacel

A coluna (1,6 x 25 cm) empacotada com uma suspensão de DEAE-Sephacel em água deionizada, foi equilibrada com aproximadamente 400 ml de tampão Tris-

acetato 25 mM, pH 6,5 contendo 1 mM de EDTA (tampão A). O fluxo da fase móvel era 48 ml/hora, a 25°C.

Aproximadamente 50 ml do filtrado da cultura de *Penicillium frequentans*, dialisado contra o tampão A, foram aplicados à coluna. O material não adsorvido à coluna foi eluído com 100 ml do tampão de equilíbrio (tampão A). As proteínas adsorvidas foram, posteriormente, eluídas por aumento da força iônica do tampão A, pela adição de concentrações crescentes de NaCl, como relacionado abaixo.

Concentração de NaCl	Volume de tampão
20 mM.....	200 ml
40 mM.....	150 ml
150 mM.....	100 ml
300 mM.....	100 ml

Frações de 5,6 ml foram coletadas a cada 7 minutos e mantidas em banho de gelo. A determinação da atividade pectinolítica foi realizada como descrito na seção 3.10. e as frações que apresentaram atividade foram reunidas.

3.9.2. Cromatografia em coluna de CM-Celulose

As enzimas não adsorvidas à coluna de DEAE-Sephacel (pico I) foram submetidas a cromatografia em coluna de CM-Celulose.

A coluna (1,6 x 25 cm) foi empacotada com aproximadamente 50 ml de uma suspensão de CM-Celulose em água deionizada e equilibrada com 400 ml de tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,0, contendo 1 mM de EDTA (tampão B). O fluxo da fase móvel era 33,5 ml/hora, a 25°C.

Aproximadamente 42 ml do pico I dialisado contra tampão B foram aplicados à coluna de CM-Celulose e o material não adsorvido foi eluído com 100 ml do mesmo tampão. As proteínas adsorvidas foram eluídas por aumento da força iônica do tampão B, pela adição de NaCl nas concentrações de 50 mM (150 ml) e 150 mM (150 ml).

As frações, coletadas a cada 10 minutos, continham aproximadamente 5,6 ml e foram mantidas em banho de gelo. A atividade pectinolítica foi determinada e as frações ativas foram reunidas.

3.10. Métodos analíticos utilizados durante os processos cromatográficos

3.10.1. Atividade diminuidora da viscosidade

Nas frações coletadas da coluna de DEAE-Sephacel e CM-Celulose, a atividade diminuidora da viscosidade foi avaliada pelo método descrito na seção 3.5.1., modificado de MILL & TUTTOBELLO (1961), utilizando-se pectina e polipectato de sódio como substrato.

As misturas de reação foram preparados com:

- 6,0 ml de solução de substrato (pectina 0,35% ou polipectato de sódio 2,0%) em tampão acetato de sódio 25 mM, pH 4,0
- 0,2 ml da amostra a ser dosada

Os tubos de reação foram agitados e mantidos em banho de gelo e a reação enzimática iniciada pela incubação em banho termostatizado a 50°C. Após 30 minutos de incubação (utilizando-se pectina) e 60 minutos (utilizando-se polipectato de sódio), as reações foram interrompidas em banho de gelo. O controle foi realizado nas mesmas condições experimentais, substituindo-se a amostra a ser dosada por igual volume de água.

A diminuição da viscosidade da solução do substrato foi calculada como descrito anteriormente na seção 3.5.1.

3.10.2. Atividade liberadora de açúcar redutor

A atividade liberadora de açúcar redutor, presente nas frações, foi avaliada pela modificação do método DNS (seção 3.5.2.), descrito por MILLER (1959), utilizando-se pectina e polipectato de sódio como substratos das reações enzimáticas.

Aos tubos de reação, mantidos em banho de gelo adicionou-se:

- 0,1 ml da solução de pectina cítrica 0,35% (p/v) ou polipectato de sódio 2,0% (p/v) em tampão acetato de sódio 25 mM, pH 4,0

- 0,2 ml da amostra a ser dosada

Os tubos de reação foram agitados e incubados a 50°C durante 15 minutos (quando utilizou-se polipectato de sódio como substrato) e 30 minutos (quando utilizou-se pectina). A reação foi interrompida em banho de gelo e pela adição de 0,3 ml de reagente DNS. Após 5 minutos em banho-maria fervente, o volume do tubo de reação, depois de resfriado, foi completado a 2 ml com água destilada. A densidade óptica foi determinada a 575 nm e comparada a uma curva padrão realizada com até 300 µg de ácido monogalacturônico.

3.10.3. Atividade de pectinesterase

De acordo com o método modificado de NASUNO & STARR (1966), a atividade de pectinesterase foi estimada por medida do decréscimo do pH e quantificada por titulação dos grupos carboxílicos liberados de uma solução de pectina cítrica.

Nos tubos de reação mantidos em banho de gelo, foi colocada a seguinte mistura:

- 2 ml da solução de pectina 1,0% (p/v) em tampão Tris-acetato 25 mM, pH 6,5 , contendo 1mM de EDTA (o pH da solução foi ajustado a 7,0 com NaOH 0,1N)

- 1 ml da solução de enzima

A mistura foi agitada e mantida em banho termostatzado a 50°C por 2 horas e a reação enzimática foi interrompida por resfriamento em banho de gelo. O controle foi realizado nas mesmas condições, substituindo-se a amostra enzimática pelo mesmo volume de solução tampão. As misturas de reação que apresentaram valores de pH inferiores ao controle, foram tituladas com solução de NaOH 0,01 N.

O número de microequivalentes de grupos carboxílicos liberados foi calculado pela seguinte expressão:

$$\text{Número de microequivalentes de COOH} = 1000.N.f.V ,$$

onde:

N = normalidade da solução de NaOH,

f = fator de correção e

V = volume gasto na titulação (ml).

Uma unidade de atividade de pectinesterase (U_{pe}) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 microequivalente de grupos carboxílicos em uma hora de reação, nas condições definidas. A atividade enzimática foi

expressa em microequivalentes de grupos carboxílicos liberados por 1 ml de amostra (U_{pe}/ml).

Nas frações coletadas das colunas, a atividade de pectinesterase foi expressa como variação do pH em relação ao controle.

3.10.4. Atividade liase

As atividades de pectina liase e pectato liase dão origem a ligações insaturadas 4,5 na molécula do substrato, as quais são avaliadas pelo aumento na densidade óptica a 235 nm, utilizando metodologia modificada de WANG & KEEN (1970) e LYON *et alii* (1986).

A atividade liase foi avaliada nos picos das frações que apresentaram proteínas.

A mistura de reação constituiu-se de:

- 1 ml da solução 1,0% (p/v) do substrato (pectina cítrica e polipectato de sódio foram utilizados para avaliação de pectina liase e pectato liase, respectivamente) em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,5 , contendo 1 mM de $CaCl_2$

- 1 ml da amostra enzimática a ser dosada

Antes e após a reação enzimática, realizada a 50°C durante 60 minutos, determinou-se a densidade óptica a 235 nm. Uma unidade de atividade liase foi definida como

a quantidade de enzima que libera 1 μmol de produto insaturado por minuto de reação, nas condições descritas.

A atividade liase também foi avaliada em pH 4,0 utilizando-se tampão acetato de sódio 25 mM na preparação de ambos os substratos.

3.10.5. Determinação de proteínas

A concentração de proteínas nas frações foi determinada pela absorção de luz ultravioleta em 280 nm. Nos picos enzimáticos, foi avaliada segundo o método descrito por Lowry *et alii* (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

3.11. Caracterização parcial das enzimas pectinolíticas

A caracterização dos picos enzimáticos foi realizada pela determinação do tipo de reação catalisada (hidrólise ou trans-eliminação), modo de atuação endo ou exo sobre o substrato (clivagem de ligações glicosídicas ao acaso no interior da molécula ou seqüencialmente, a partir de uma das extremidades) e determinação do substrato preferido (pectina ou polipectato de sódio).

3.11.1. Estudos sobre o modo de ação das enzimas pectinolíticas sobre o substrato

Sabe-se que a clivagem ao acaso das ligações glicosídicas, por atuação de enzimas de caráter endo, diminui drasticamente a viscosidade da solução de pectina ou polipectato de sódio, sem aumento marcante na produção de grupos redutores, e que a ação das enzimas de caráter exo, tem por efeito liberar muitos grupos redutores, sem alterar significativamente a viscosidade da solução contendo o substrato (ROMBOUTS & PILNIK, 1972; DAHODWALA *et alii*, 1974; CALL *et alii*, 1985).

Para determinar o tipo de atuação de cada pico enzimático, realizou-se experimentos onde foram comparadas concomitantemente as velocidades de decréscimo da viscosidade com a liberação de açúcar redutor de uma solução de polipectato de sódio. Procedeu-se em seguida a análise cromatográfica dos produtos de reação.

3.11.1.1. Viscosidade relativa e clivagem das ligações glicosídicas

A reação enzimática foi realizada em frascos Erlenmeyer, nos quais foram colocados 48 ml de uma solução de polipectato de sódio 2,0% (p/v) em tampão acetato de sódio 25 mM, pH 4,0. O substrato da reação foi incubado em

banho termostatzado a 50°C até a estabilização da temperatura e as amostras dos picos enzimáticos foram individualmente adicionadas, agitando-se a mistura.

Alíquotas de 6 ml das misturas de reação foram retiradas em intervalos de tempos definidos, nas quais avaliou-se o decréscimo da viscosidade relativa. Para a determinação dos grupos redutores liberados, retirou-se nos mesmos intervalos de tempo, alíquotas de 0,01 a 0,3 ml, dependendo da atividade das amostras enzimáticas.

Os grupos redutores liberados foram expressos em porcentagem de ligações glicosídicas hidrolisadas, considerando-se a liberação de 62 mM de ácido monogalacturônico como 100% de hidrólise. Esse valor foi obtido pela completa degradação da solução de polipectato de sódio 2,0% com uma solução de Ultrazym 100G 10 mg/ml (pectinase comercial da Novo Industri).

3.11.1.2. Análise cromatográfica dos produtos de reação enzimática

Para caracterização através de análise cromatográfica dos produtos de reação de cada pico enzimático, o seguinte procedimento experimental foi adotado: a 0,5 ml da solução de polipectato de sódio 2,0% (p/v) em tampão acetato de sódio 25 mM, pH 4,0, adicionou-se separadamente 0,16 ml dos picos I.2, I.5 e V;

0,1 ml dos picos II e III ou 0,05 ml do pico IV. A mistura de reação foi incubada em banho termostatzado a 50°C e as alíquotas, retiradas em intervalos de tempo definidos, foram mantidas em banho de gelo.

Os produtos da reação enzimática foram submetidos a cromatografia em camada delgada utilizando-se sílica-G (DGS-Riedel) como adsorvente. Sobre placas de vidro (20 x 20 cm) foi espalhada uma suspensão de sílica em água destilada (1:2) formando uma camada de 0,5 mm. Em seguida, as placas de sílica foram secas em estufa a 50°C.

Uma alíquota de 0,01 ml da mistura de reação foi aplicada na placa de sílica, a amostra foi seca com ar quente e a seguir, repetiu-se esse procedimento. Utilizou-se como padrão uma solução de ácido monogalacturônico 2 mg/ml.

A fase móvel foi preparada com n-butanol, água destilada e ácido acético nas proporções de 5:3:2 (RIED & COLLMER, 1986). Após o desenvolvimento do cromatograma durante 4 horas, as placas foram colocadas em estufa a 50°C para secagem.

A revelação do cromatograma foi realizada pela aspersão de soluções corantes preparadas com 10 mg de naftoresorcinol, 5 ml de etanol e 0,1 ml de ácido sulfúrico e secagem a 50°C (DEMAIN & PHAFF, 1954) ou com vanilina 1,0% (p/v) em ácido sulfúrico concentrado e secagem em estufa a 120°C (CALL *et alii*, 1985).

3.11.2. Estudo sobre a especificidade das enzimas pectinolíticas quanto ao substrato

O substrato preferido para a atividade das enzimas foi determinado pela quantificação dos grupos redutores liberados de uma solução de polipectato de sódio ou pectina 55% esterificada.

A mistura de reação constituiu-se de:

- 1,2 ml da solução de substrato 1,0% (p/v) em tampão acetato de sódio 25 mM, pH 4,0
- 0,1 ml dos picos II, III e IV ou 0,4 ml dos picos I.2, I.5 e V

A reação foi realizada a 50°C e em intervalos definidos de tempo, alíquotas de 0,05 ou 0,1 ml da mistura de reação foram retiradas para avaliação dos grupos redutores liberados, conforme descrito na seção 3.10.2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I - DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES IDEAIS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

Uma vez que a produção de enzimas por microrganismos, está intimamente ligada às condições ambientais oferecidas à cultura microbiana, estudou-se numa primeira etapa, a influência de diferentes fatores ambientais sobre a produção de enzimas pectinolíticas extracelulares de *Penicillium frequentans*.

4.1. Efeito da concentração de pectina no meio de cultivo

Nas culturas desenvolvidas em meio de cultivo preparado como descrito na seção 3.6.A. , verificou-se que os maiores níveis de atividades enzimáticas (1,03 UV/ml e 0,54 U/ml, respectivamente para as atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor), foram detectados nos filtrados das culturas suplementadas com 0,5% de pectina (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da concentração de pectina sobre a produção de enzimas pectinolíticas.

Concentração de Pectina (%)	Atividade Diminuidora da Viscosidade (UV/ml)	Atividade Liberadora de Açúcar Redutor (U/ml)	Biomassa (mg)
0,3	0,91	0,45	11,40
0,5	1,03	0,54	17,80
0,8	0,81	0,32	16,50
1,0	0,80	0,32	16,00
1,5	0,73	0,32	15,80

Condições de cultivo: Inóculo com 5.10^6 esporos/ml; esporos de 5 dias; pH 3,5; temperatura 30°C; 20 horas de cultivo sob agitação.

Na presença de 0,3% desse substrato, as atividades pectinolíticas (0,91 UV/ml e 0,45 U/ml) foram semelhantes às produzidas com 0,5%; no entanto, o crescimento micelial foi 31% menor que nas demais concentrações. Isso demonstra que nas culturas suplementadas com 0,3% de pectina houve uma maior produção de atividade pectinolítica por unidade de massa celular. Se considerarmos a produção de enzimas pectinolíticas em escala industrial, a utilização de meios suplementados com 0,3% de pectina pode ser mais vantajosa, já que fornecendo-se 40% menos substrato obtém-se um decréscimo de apenas 15% na atividade pectinolítica.

Em culturas suplementadas com concentrações de pectina superiores a 0,5%, as atividades enzimáticas decresceram e atingiram nas culturas suplementadas com 1,5% de pectina, aproximadamente 71 e 59% das atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor. Essa diminuição na atividade enzimática extracelular sugere que houve ou repressão da síntese das enzimas pectinolíticas ou inibição da atividade das mesmas, por um ou mais produtos metabólicos da degradação enzimática da pectina. Outros fungos também mostraram-se sensíveis à repressão catabólica, como *Aspergillus sp.* (AGUILAR & HUITRON, 1986), *Aspergillus niger* (MALDONADO & CALLIERI, 1989) e *Botrytis cinerea* (LEONE & VAN DEN HEUVEL, 1987).

A produção de enzima com atividade liberadora de açúcar redutor foi mais sensível às concentrações de pectina superiores a 0,5% do que a produção de enzima com atividade diminuidora da viscosidade, no entanto, AGUILAR & HUITRON (1986) e LARIOS *et alii* (1989) observaram fenômeno contrário em algumas linhagens de *Aspergillus*, onde a atividade diminuidora da viscosidade era a mais sensível à repressão catabólica.

4.2. Efeito do pH inicial do meio de cultivo

Quando *Penicillium frequentans* foi cultivado nas condições descritas na seção 3.6.B.,

verificou-se que os maiores níveis de atividade diminuidora da viscosidade foram obtidas nos meios de cultivo cujo pH inicial era 2,0 - 2,5 (aproximadamente 0,9 UV/ml) e em pH 8,0 (0,73 UV/ml). Em valores de pH superiores a 3,0 , verificou-se que a atividade diminuidora da viscosidade diminuiu gradativamente, atingindo os menores níveis em pH 5,0 (0,32 UV/ml), no entanto, em pH 8,0 a atividade detectada era novamente alta (0,73 UV/ml) (Tabela 2). A atividade liberadora de açúcar redutor apresentou comportamento semelhante e os maiores valores dessa atividade foram obtidos em pH 2,0 - 2,5 (aproximadamente 0,7 U/ml) e pH 7,0 - 8,0 (aproximadamente 0,6 U/ml).

Tabela 2. Efeito do pH inicial do meio de cultivo sobre a produção de enzimas pectinolíticas.

pH Inicial	pH Final	Atividade Diminuidora da Viscosidade (UV/ml)	Atividade Liberadora de Açúcar Redutor (U/ml)	Biomassa (mg)
2,0	2,2	0,87	0,62	7,40
2,5	2,3	0,93	0,77	20,67
3,0	2,6	0,67	0,48	19,10
3,5	3,0	0,59	0,36	17,73
4,0	3,1	0,58	0,42	18,60
5,0	3,3	0,32	0,24	19,07
6,0	3,6	0,36	0,26	20,47
7,0	5,0	0,58	0,57	21,20
8,0	6,4	0,73	0,64	22,67

Condições de cultivo: Inóculo com 5.10^6 esporos/ml; esporos de 5 dias; concentração de pectina 0,8%; temperatura 30°C; 20 horas de cultivo sob agitação.

A necessidade de pH ácido do meio de cultivo requerida por *Penicillium frequentans*, para produzir altos níveis de enzimas pectinolíticas, é citada também para outros fungos produtores destas enzimas, como *Aspergillus niger* (BAILEY & PESSA, 1990), *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 (LARIOS *et alii*, 1989) e *Aureobasidium pullulans* (PETRUCCIOLI *et alii*, 1989).

Desde que hidrolases e liases são capazes de diminuir a viscosidade de uma solução de pectina, decidimos investigar se a atividade que estávamos analisando nos dois intervalos de pH (2,0 - 2,5 e 7,0 - 8,0) era composta só por hidrolases ou se havia também a presença de liases. Em culturas cujo pH inicial era 2,5 não detectou-se a presença de pectina liase, mas naquelas cultivadas em pH 8,0, altos níveis desta atividade foram obtidos. Também em outros fungos, como o *Fusarium roseum* (PERLEY & PAGE, 1971) e *Verticillium albo-atrum* (DURRANDS & COOPER, 1988), verificou-se que a produção de poligalacturonase era maior em meio ácido, enquanto que maior atividade liase era detectada em meio alcalino.

Na maioria das culturas houve uma tendência ao abaixamento do pH inicial, provavelmente devido a atividade metabólica do microrganismo.

Com relação à biomassa, observa-se que o crescimento de *Penicillium frequentans* foi pouco influenciado pelos valores iniciais do pH do meio de

cultivo, exceto em pH 2,0 , quando o crescimento micelial foi 2,7 vezes menor que a média dos demais.

4.3. Efeito da idade das culturas utilizadas no inóculo

Para inocular os meios de cultivo utilizou-se esporos de *Penicillium frequentans* de várias idades, como descrito na seção 3.6.C., e verificou-se que os maiores níveis de atividade diminuidora da viscosidade (0,69 UV/ml), atividade liberadora de açúcar redutor (0,44 U/ml) e massa micelial foram obtidos com esporos provenientes de culturas com 10 dias (Tabela 3). Esporos com 12 dias originaram culturas com menor crescimento micelial, e níveis de enzimas inferiores aos obtidos com esporos de 10 dias, sugerindo que aqueles não mais se encontravam em plena capacidade fisiológica para germinar e desenvolver-se. Os esporos de 5 dias apresentaram comportamento semelhante, mas provavelmente por imaturidade fisiológica dos mesmos.

4.4. Efeito da concentração do inóculo

No cultivo realizado como descrito na seção 3.6.D., verificou-se que a biomassa final das culturas esteve relacionada ao número presente de conídios que germinaram (Tabela 4).

Tabela 3. Efeito da idade das culturas utilizadas no inóculo sobre a produção de enzimas pectinolíticas.

Idade das Culturas (dias)	Atividade Diminuidora da Viscosidade (UV/ml)	Atividade Liberadora de Açúcar Redutor (U/ml)	Biomassa (mg)
5	0,59	0,27	13,73
7	0,63	0,31	15,00
10	0,69	0,44	19,93
12	0,58	0,25	12,13

Condições de cultivo: Inóculo com $5 \cdot 10^6$ esporos/ml; concentração de pectina 0,8%; pH 3,5; temperatura 30°C; 20 horas de cultivo sob agitação.

Tabela 4. Efeito da concentração do inóculo sobre a produção de enzimas pectinolíticas.

Concentração do Inóculo (esporos/ml)	Atividade Diminuidora da Viscosidade (UV/ml)	Atividade Liberadora de Açúcar Redutor (U/ml)	Biomassa (mg)
$5 \cdot 10^5$	0,21	0,15	1,20
$5 \cdot 10^6$	0,62	0,30	13,75
$5 \cdot 10^7$	0,96	0,83	24,85
$1 \cdot 10^8$	0,73	0,78	26,05

Condições de cultivo: Inóculo com esporos de 5 dias; concentração de pectina 0,8%; pH 3,5; temperatura 30°C; 20 horas de cultivo sob agitação.

Assim como o crescimento micelial, as atividades enzimáticas apresentaram-se crescentes com o aumento no número de esporos, atingindo os maiores níveis quando a concentração era 5.10^7 esporos/ml (0,96 UV/ml e 0,83 U/ml). Quando o dobro dessa concentração foi utilizada, verificou-se que a atividade diminuidora da viscosidade foi reduzida em aproximadamente 24% , enquanto que a atividade liberadora de açúcar redutor permaneceu praticamente inalterada.

Esse efeito variável da concentração de esporos sobre a produção de diferentes enzimas pectinolíticas foi observado também por FRIEDRICH *et alii* (1990) que trabalhando com esporos de *Aspergillus niger*, nas concentrações de 10^2 a 10^8 esporos/l, obtiveram uma diminuição na atividade de poligalacturonase com as maiores concentrações de inóculo, mas um efeito contrário, foi observado para pectina liase, enquanto a pectinesterase não apresentou qualquer correlação com a concentração do inóculo.

Observou-se também, que após 20 horas de incubação, os níveis de enzimas pectinolíticas não eram proporcionais à massa micelial produzida na cultura, visto que com 1.10^8 esporos/ml obteve-se a maior massa micelial mas não os maiores níveis enzimáticos; esse mesmo fato foi verificado com *Aspergillus niger* (TUTTOBELLO & MILL, 1961).

4.5. Efeito da temperatura

A temperatura de cultivo é uma das condições ambientais mais estudadas devido principalmente a seu efeito bastante variável nas diferentes linhagens de fungos. Nas culturas de *Penicillium frequentans* incubadas nas condições descritas na seção 3.6.E., verificou-se que nas temperaturas a 30 e 35°C, os níveis das atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor eram semelhantes, mas houve maior crescimento micelial a 30°C (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da temperatura sobre a produção de enzimas pectinolíticas.

Temperatura (°C)	Atividade Diminuidora da Viscosidade (UV/ml)	Atividade Liberadora de Açúcar Redutor (U/ml)	Biomassa (mg)
25	0,40	0,22	8,00
30	0,57	0,26	12,55
35	0,59	0,25	8,47
40	0,00	0,15	0,00

Condições de cultivo: Inóculo com 5.10^6 esporos/ml; esporos de 5 dias; concentração de pectina 0,8%; pH 3,5; 20 horas de cultivo sob agitação.

Os fungos *Aspergillus niger* C e *Aspergillus foetidus* também produziram maiores níveis de enzimas pectinolíticas, respectivamente, a 35 e 30°C (FIEDUREK *et alii*, 1989; HOURS *et alii*, 1988b), enquanto que *Aureobasidium pullulans* apresentou máxima atividade em temperaturas entre 24 e 27°C (PETRUCCIOLI *et alii*, 1989). Ao contrário do que foi verificado para *Penicillium frequentans*, a produção de poligalacturonase por *Aspergillus niger*, cultivado em meio suplementado com pectina, não foi afetada pela temperatura entre os valores 25 e 40°C, mas a produção de pectinesterase foi maior a 30°C (MALDONADO & CALLIERI, 1989).

O comportamento diferente, da produção de biomassa e atividade pectinolítica, frente à temperatura de cultivo foi citada também para *Aspergillus sp.* CH-Y-1043, que ao contrário do que foi verificado para *Penicillium frequentans*, apresentou crescimento micelial praticamente igual a 29 e 37°C, mas a atividade de endopoligalacturonase era maior na última temperatura (LARIOS *et alii*, 1989).

No filtrado da cultura incubada a 40°C não houve produção de biomassa nem de atividade diminuidora da viscosidade, mas detectou-se 58% da atividade liberadora de açúcar redutor máxima (obtida a 35°C), provavelmente pela liberação das enzimas presentes nos esporos utilizados no inóculo do meio de cultivo.

O crescimento e a produção de atividade pectinolítica por *Penicillium frequentans* em altas temperaturas, pode ser vantajoso no processo de produção em escala industrial, pois o custo de resfriamento pode ser reduzido.

4.6. Determinação do tempo de produção das enzimas pectinolíticas nas condições ideais de cultivo

A produção de enzimas pectinolíticas parece estar estritamente relacionada com outros parâmetros, tais como: pH (MANACHINI *et alii*, 1988), temperatura (LARIOS *et alii*, 1989), concentração e tipo de substrato (FEDERICI & PETRUCCIOLI, 1985; PETRUCCIOLI *et alii*, 1989), concentração do inóculo (FRIEDRICH *et alii*, 1990), agitação e aeração (FRIEDRICH *et alii*, 1989).

Verificou-se nas culturas agitadas mantidas nas condições citadas na seção 3.6.F. , que até a 6ª hora de cultivo não foi detectada atividade diminuidora da viscosidade, e somente um pequeno aumento na atividade liberadora de açúcar redutor (0,04 U/ml), enquanto a biomassa atingiu 3,25 mg (Figura 1A). A partir da 10ª hora, o crescimento celular entrou na fase logarítmica e a produção de atividade pectinolítica acompanhou o aumento da biomassa até a 17ª hora, quando os maiores níveis das atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de

açúcar redutor foram obtidas (respectivamente 0,95 UV/ml e 0,91 U/ml). A seguir, ambas atividades foram reduzidas gradativamente atingindo na 30ª hora de cultivo, respectivamente 86 e 61% das atividades obtidas na 17ª hora. A razão para a estabilização e diminuição na atividade pectinolítica, observada após 17 horas de cultivo agitado, pode estar relacionada ao consumo de algum composto essencial, aparecimento de um inibidor ou à própria desnaturação das enzimas já sintetizadas.

O substrato indutor foi mais rapidamente consumido durante a fase de maior produção de biomassa e atividade pectinolítica, isto é, da 6ª a 17ª hora, quando aproximadamente 80% da pectina foi degradada e utilizada pelo microrganismo. No final do processo de fermentação, nestas condições, restava aproximadamente 12% da pectina adicionada ao meio de cultivo. Essa relação entre a síntese de enzimas pectinolíticas com o crescimento micelial e decréscimo na concentração do substrato indutor também foi verificada por outros autores em diversos microrganismos, como: *Aspergillus sp.* (AGUILAR & HUITRON, 1986), *Aureobasidium pullulans* (SAKAI & TAKAOKA, 1985), *Aspergillus foetidus* (HOURS *et alii*, 1988a) e a levedura *Cryptococcus albidus* var. *albidus* (FEDERICI *et alii*, 1988).

O pH do meio de cultivo permaneceu praticamente inalterado no intervalo de 2,6 a 3,0 (resultado não mostrado).

Figura 1. Curva de tempo de produção das enzimas pectinolíticas nas condições estabelecidas.

Conídios de *Penicillium frequentans* com 10 dias, foram inoculados ($5 \cdot 10^7$ esporos/ml) em meio de cultivo (pH 2,5) suplementado com 0,5% de pectina. As culturas foram incubadas a 35°C por períodos de tempos definidos; A) sob agitação e B) em condição estacionária.

Atividade diminuidora da viscosidade (□); atividade liberadora de açúcar redutor (x); biomassa (Δ); substrato residual (+).

Nas culturas mantidas em condição estacionária (como relatado na seção 3.6.F.), verificou-se que no 1º dia de incubação houve uma pequena produção das atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor, respectivamente 0,22 UV/ml e 0,28 U/ml. A primeira atingiu os maiores níveis no 2º dia de cultivo (2,39 UV/ml), e decresceu em aproximadamente 12%, até o 4º dia; enquanto que a segunda pode-se dizer que manteve-se estável a partir do 2º dia (0,59 U/ml). A biomassa aumentou gradativamente até o 2º dia (9,9 mg) e em períodos de tempo maiores, observamos uma queda na massa micelial (Figura 1B). Isso pode ter sido ocasionado por uma limitação no suprimento de oxigênio, já que a superfície da cultura estava coberta com uma fina camada micelial, além daquelas suposições já citadas para cultura agitada.

O pH permaneceu praticamente constante, em torno de 2,5, durante todo o período de incubação (resultado não mostrado), indicando que o mesmo esteve dentro da faixa ótima para biossíntese de enzimas pectinolíticas durante toda a fase produtiva da cultura, tornando desnecessário seu controle, o que é vantajoso do ponto de vista industrial.

Comparando-se as duas condições de incubação, verificou-se que as atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor produzidas durante 24 horas, em cultivo sob agitação, foram

respectivamente 4,1 e 2,75 vezes maiores que as atividades obtidas no mesmo tempo de incubação em condição estacionária. A atividade pectinolítica avaliada por diminuição da viscosidade, mas não por liberação de açúcar redutor, foi maior quando o fungo *Penicillium frequentans* cresceu por 48 horas em cultura estacionária do que no cultivo agitado por 17 horas, mas a produção por unidade de tempo foi maior na última condição, demonstrando que o cultivo sob agitação é o mais adequado para a produção de atividade pectinolítica por esse fungo. MANACHINI *et alii* (1987), no entanto, verificaram que *Rhizopus stolonifer*, ao contrário do fungo *Penicillium frequentans*, produziu máxima atividade enzimática dentro de 48 a 52 horas em cultivo estacionário, enquanto que em cultura agitada, a máxima atividade pectinolítica, obtida após 7 dias, era 50% menor que na primeira condição.

PARTE II - ESTUDO DOS MECANISMOS REGULATORIOS

4.7. Determinação dos substratos indutores

Verificou-se nas culturas realizadas como descrito na seção 3.7.1., que todas as fontes de carbono utilizadas, exceto a lactose, permitiram o crescimento de *Penicillium frequentans*, mas a produção de enzimas pectinolíticas foi obtida somente nas culturas de

Penicillium frequentans que continham substâncias pécticas (Tabela 6).

Os maiores níveis de atividade pectinolítica foram encontrados quando utilizou-se pectina como substrato, sendo que a atividade diminuidora da viscosidade (2,22 UV/ml) foi 1,8 vezes superior àquela obtida com ácido poligalacturônico, enquanto que a atividade liberadora de açúcar redutor (1,19 U/ml), foi aproximadamente o dobro.

As atividades diminuidora da viscosidade encontradas nos meios de cultivo suplementados com ácido poligalacturônico e com "citrus pulp pellets" eram semelhantes (1,26 e 1,24 UV/ml, respectivamente), mas a atividade liberadora de açúcar redutor era 27% maior quando ácido poligalacturônico foi o substrato indutor.

Em presença de ácido monogalacturônico, o microrganismo produziu 8,1 e 8,4% das atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor, respectivamente, em relação aos níveis obtidos nas culturas suplementadas com pectina.

Penicillium frequentans produziu níveis insignificantes de atividade diminuidora da viscosidade quando o meio de cultivo foi suplementado com manitol, manose ou sacarose como indutores, assim como o *Aspergillus niger* sp. cultivado na presença de arabinose, xilose, ramanose e galactose, os quais são açúcares presentes na molécula de pectina (MALDONADO *et alii*, 1989). Ao

contrário, frutose, manose, sacarose e celobiose induziram em *Aspergillus niger* C, alta atividade pectinolítica (FIEDUREK *et alii*, 1989), mostrando que outras fontes de carbono além das substâncias pécticas, podem induzir a síntese dessas enzimas em alguns fungos.

Esses resultados mostram que as enzimas pectinolíticas são induzíveis por várias substâncias pécticas, e o melhor indutor, nas condições estudadas, foi a pectina, o que foi observado também para *Rhizopus stolonifer* (MANACHINI *et alii*, 1987), *Fusarium roseum* (PERLEY & PAGE, 1971) e *Aspergillus sp.* (AGUILAR & HUITRON, 1986).

Tabela 6. Efeito de diferentes substratos sobre a síntese de enzimas pectinolíticas.

Substrato (0,5%)	Atividade Diminuidora da Viscosidade (UV/ml)	Atividade Liberadora de Açúcar Redutor (U/ml)	Biomassa (mg)
Ácido monogalacturônico	0,18	0,10	12,20
Ácido poligalacturônico	1,26	0,56	15,80
Manitol	0,02	0,00	15,50
Manose	0,01	0,00	27,10
Pectina	2,22	1,19	17,40
Sacarose	0,05	0,00	31,40
"Citrus Pulp Pellets"	1,24	0,41	---

Condições de cultivo: Inóculo com 5.10^6 esporos/ml; esporos de 10 dias; pH 2,5; temperatura 35°C; 24 horas de cultivo sob agitação.

Estudos que visam a utilização de resíduos agroindustriais, como casca de laranja (FEDERICI & PETRUCCIOLI, 1985; PETRUCCIOLI *et alii*, 1989), e casca de limão pré-tratada (MALDONADO *et alii*, 1986) ou não (LARIOS *et alii*, 1989), foram realizados devido às quantidades apreciáveis de pectina que eles contêm e à natureza indutiva das enzimas pectinolíticas. Nas condições de cultivo estabelecidas, "citrus pulp pellets" mostrou-se capaz de induzir altos níveis de enzimas pectinolíticas nas culturas de *Penicillium frequentans*, semelhantes aos obtidos com ácido poligalacturônico, porém inferiores à pectina cítrica. A produção de enzimas pectinolíticas utilizando esse resíduo como indutor, poderá ser otimizada adaptando-se as condições de cultivo de *Penicillium frequentans* nesse substrato.

4.8. Efeito de glicose

O efeito de glicose foi estudado nas culturas realizadas como relatado na seção 3.7.2., onde observou-se que tanto a atividade diminuidora da viscosidade como a liberadora de açúcar redutor foram influenciadas pela presença de glicose no meio de cultivo (Figura 2). Os maiores níveis de atividade enzimática (aproximadamente 0,35 UV/ml e 1,9 U/ml) foram obtidos 10 horas após o inóculo em meio de cultivo cuja única fonte de

Figura 2. Efeito de glicose sobre a síntese e secreção das enzimas pectinolíticas.

Culturas de *Penicillium frequentans* foram pré-crescidas em meio de cultura contendo 2,4% de glicose, durante 24 horas sob agitação. A massa celular obtida foi transferida para meio de cultivo fresco, contendo pectina 0,8% (p/v) e glicose nas concentrações indicadas, e as culturas foram mantidas a 30°C sob agitação constante. A) atividade diminuidora da viscosidade; B) atividade liberadora de açúcar redutor.

Pectina 0,8% (X); pectina 0,8% + glicose 0,8% (+); pectina 0,8% + glicose 1,6% (□); pectina 0,8% + glicose 2,4% (Δ).

carbono era a pectina. Quando a concentração de pectina e glicose eram iguais (0,8%), as maiores atividades pectinolíticas foram obtidas na 18ª hora de incubação. Dobrando-se a concentração de glicose em relação à de pectina, obteve-se após 24 horas, respectivamente 88 e 47% das máximas atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor; triplicando-se, mesmo após 24 horas, não detectou-se níveis enzimáticos significativos. Portanto, o fungo *Penicillium frequentans* parece sofrer repressão catabólica, visto que quanto maior a concentração de glicose presente no meio de cultura, maior o tempo necessário à produção das enzimas pectinolíticas.

Os fenômenos regulatórios associados à produção de pectinase por fungos têm sido pouco estudados, apesar da importância que tais informações têm a nível industrial sendo que o "efeito glicose" varia de um microrganismo para outro e depende da concentração utilizada. Como constatado por KEEN & HORTON (1966) em *Pyrenochaeta terrestris*, e LEONE & VAN DEN HEUVEL (1987) em *Botrytis cinerea*, o efeito repressor dependia, respectivamente, da concentração de glicose e ácido monogalacturônico presente nos meios de cultivo; enquanto que linhagens de *Aspergillus niger* (LEUCHTENBERGER *et alii*, 1989 e MALDONADO *et alii*, 1989) não eram reprimidas por glicose ou outros açúcares, ou apresentaram enzimas constitutivas.

O efeito de glicose foi mais pronunciado na atividade liberadora de açúcar redutor, ao contrário do que foi constatado em *Aspergillus sp.* (AGUILAR & HUITRON, 1987), no qual o efeito de repressão catabólica era mais pronunciado na atividade medida por diminuição da viscosidade do que por liberação de açúcar redutor.

PARTE III - CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO PECTINOLÍTICO

4.9. Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas pectinolíticas

A atividade do complexo pectinolítico, avaliada como descrito na seção 3.8.1., é mostrada na Figura 3. Observa-se que a maior atividade diminuidora da viscosidade foi detectada quando a temperatura de reação era 55°C, diminuindo gradativamente em temperaturas superiores ou inferiores a essa. Um aumento ou redução de 10°C nessa temperatura provocou, respectivamente, uma redução de 16,6 e 19% na atividade máxima. A 30°C observou-se uma diminuição na atividade enzimática de 43% e, nas incubações a 70°C, a atividade diminuidora da viscosidade era 55% menor que a obtida a 55°C; mostrando que temperaturas acima de 65°C provocam uma rápida desnaturação das enzimas.

Figura 3. Efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas pectinolíticas.

A reação enzimática foi realizada adicionando-se a amostra da enzima à solução de pectina 0,5%, estabilizada em várias temperaturas. Atividade diminuidora da viscosidade (—); atividade liberadora de açúcar redutor (---).

A maior atividade liberadora de açúcar redutor foi detectada a 50°C e temperaturas acima de 55°C provocaram uma rápida diminuição nessa atividade. Abaixo de 50°C, a atividade liberadora de açúcar redutor diminuiu gradativamente atingindo aproximadamente 35% da atividade máxima, a 30°C.

Esses valores de temperatura ótima de reação estão de acordo com os valores encontrados para outros fungos filamentosos, que geralmente variam entre 40 e 62°C (ROMBOUTS & PILNIK, 1972; FOGART & KELLY, 1983; MANACHINI

et alii, 1988; PARINI *et alii*, 1988; GILLESPIE *et alii*, 1990; BAILEY & PESSA, 1990).

Comparando-se as atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor em diferentes temperaturas de reação, nota-se que nas condições experimentais padronizadas, a segunda atividade é muito sensível às temperaturas acima de 55°C, perdendo rapidamente sua atividade. Considerou-se portanto, que 50°C é a melhor temperatura para avaliação de ambas atividades pectinolíticas.

4.10. Efeito do pH sobre a atividade das enzimas pectinolíticas

Na Figura 4 são mostradas as atividades pectinolíticas obtidas nas condições de reação descritas na seção 3.8.2. Observa-se que as atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor foram maiores em pH ácido e, que os perfis das curvas de porcentagem de atividade apresentaram vários picos.

Os maiores valores de atividade diminuidora da viscosidade foram obtidos quando o pH do meio de reação estava entre 4,0 e 5,4, diminuindo acentuadamente em valores de pH mais elevados e atingindo em pH 6,0 e 7,0, respectivamente, 33 e 8% da atividade máxima observada em

pH 5,0. A atividade liberadora de açúcar redutor foi detectada num intervalo mais amplo de valores de pH (2,6 a 6,0). Em pH 6,3 houve uma queda acentuada nos níveis dessa atividade, sendo detectada somente 8% daquela obtida em pH 5,6. Os valores de pH ótimo de reação estão incluídos no intervalo de pH encontrado para outros fungos, que geralmente varia de 3,8 a 5,5 para as hidrolases, e de 5,8 a 8,7 para as liases (ROMBOUTS & PILNIK, 1972; FOGART & KELLY, 1983; MANACHINI *et alii*, 1988; PARINI *et alii*, 1988; GILLESPIE *et alii*, 1990; BAILEY & PESSA, 1990).

Figura 4. Efeito do pH sobre a atividade das enzimas pectinolíticas.

A reação enzimática foi realizada adicionando-se a amostra de enzima à solução de pectina 0,5% em tampão ácido cítrico - fosfato dissódico 25 mM, com diferentes valores de pH. Atividade diminuidora da viscosidade (—); atividade liberadora de açúcar redutor (---).

Os perfis das curvas de atividade das enzimas pectinolíticas, presentes no filtrado das culturas em diferentes valores de temperatura e pH (Figuras 3 e 4), diferem das curvas típicas para enzimas purificadas (em forma de sino), o que é esperado por tratar-se de um complexo enzimático. Isso pode ser explicado pelo fato de isoenzimas produzidas por um mesmo fungo apresentarem valores de pH e temperatura ótimos diferentes (MARCUS *et alii*, 1986; MANACHINI *et alii*, 1988).

4.11. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas

A Figura 5 apresenta a atividade pectinolítica residual após tratamento térmico realizado como descrito na seção 3.8.3. As enzimas pectinolíticas de *Penicillium frequentans* mostraram-se bastante estáveis em temperaturas iguais a 40°C. Observa-se na Figura 5A, que após 30 minutos de incubação a 40°C houve uma diminuição de aproximadamente 10% na atividade diminuidora da viscosidade, a qual manteve-se constante até 120 minutos. A atividade liberadora de açúcar redutor (Figura 5B), no entanto, não diminuiu até 60 minutos de incubação na mesma temperatura, apresentando uma leve redução (em torno de 5%) na sua atividade enzimática após 120 minutos.

Figura 5. Efeito da temperatura sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas.

A amostra enzimática foi previamente incubada em várias temperaturas, e em seguida, avaliou-se a atividade enzimática residual. Temperaturas: 40°C (Δ); 50°C (+); 60°C (x); 70°C (□). A) atividade diminuidora da viscosidade; B) atividade liberadora de açúcar redutor.

A 50°C, as enzimas pectinolíticas começaram a ser inativadas; respectivamente 20 e 50% da atividade diminuidora da viscosidade foi perdida após 60 e 120 minutos de incubação nessa temperatura. Esse efeito foi mais pronunciado na atividade liberadora de açúcar redutor, que nas mesmas condições, perdeu 52 e 62% de sua atividade.

Nos primeiros 15 minutos de incubação a 60 e 70°C, foi verificada inativação rápida das enzimas ; perdeu-se respectivamente 88 e 92% da atividade diminuidora da viscosidade e 56 e 64% da atividade liberadora de açúcar redutor.

A diferença no comportamento frente aos tratamentos térmicos, sugere que a dosagem enzimática por diminuição da viscosidade e liberação de açúcar redutor realmente avalia enzimas pectinolíticas distintas. Alguns autores verificaram que o extrato bruto das enzimas era mais tolerante ao aquecimento, do que as enzimas purificadas, sugerindo que fatores proteicos (ou impurezas) ainda não identificados estabilizariam as enzimas contra a desnaturação térmica (LIU & LUH, 1978; WANG & KEEN, 1970; GILLESPIE *et alii*, 1990).

4.12. Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas

A Tabela 7 apresenta a atividade pectinolítica residual após tratamento em diferentes valores de pH, como descrito na seção 3.8.4. Observa-se que a estabilidade da atividade diminuidora da viscosidade permaneceu praticamente constante em todo o intervalo de pH testado, sendo que a atividade residual não foi menor que 85%. O mesmo verificou-se para a atividade liberadora de açúcar redutor, que apresentou-se também bastante estável nos diferentes valores de pH. Maior estabilidade foi encontrada em pH próximo a 6,3, e quando o pH era 5,2, não apresentou mais que 30% de diminuição na atividade.

A poligalacturonase de *Aspergillus niger* também apresentou boa estabilidade entre pH 2,5 e 8,5 BAILEY & PESSA (1990), no entanto, a maioria dos trabalhos mostram que as enzimas pectinolíticas purificadas são inativadas em pH alcalino (SAKAI & TAKAOKA, 1985; MILL, 1966; WANG & KEEN, 1970).

Tabela 7. Efeito do pH sobre a estabilidade das enzimas pectinolíticas.

pH	Atividade Diminuidora da Viscosidade Residual (%)	Atividade Liberadora de Açúcar Redutor Residual (%)
2,6	94,4	86,5
3,1	99,0	91,1
3,5	85,4	85,3
3,9	100,0	86,1
4,3	86,7	80,7
4,7	86,7	77,2
5,2	88,0	72,6
5,6	90,7	77,2
6,0	92,5	91,1
6,3	89,2	100,0
6,7	91,6	95,4
7,1	100,0	91,1
7,5	93,8	83,4
7,8	90,4	95,0
7,9	87,3	77,2
8,2	87,0	80,3

A amostra enzimática foi previamente incubada por 30 minutos em tampão ácido cítrico-fosfato dissódico 25 mM, em diferentes valores de pH. Em seguida, procedeu-se a avaliação da atividade enzimática residual.

PARTE IV - SEPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS ENZIMAS PECTINOLÍTICAS

4.13. Cromatografia das enzimas pectinolíticas do filtrado da cultura em coluna de DEAE-Sephacel

As enzimas pectinolíticas extracelulares, presentes no filtrado das culturas de *Penicillium frequentans*, foram separadas por cromatografia em coluna de DEAE-Sephacel, conforme metodologia descrita na seção 3.9.1. O processo cromatográfico foi acompanhado por determinação da absorbância em 280 nm e por medida das atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor, utilizando-se polipectato de sódio e pectina como substratos e atividade de pectinesterase, empregando-se pectina como substrato, conforme descrito na seção 3.10.

A Figura 6 mostra que a atividade pectinolítica do filtrado foi separada em cinco picos enzimáticos principais. As enzimas não adsorvidas à coluna (frações 4 a 15), eluídas no tampão de Tris-acetato 25 mM, pH 6,5 contendo 1 mM de EDTA (tampão A), apresentaram atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor, com os substratos polipectato de sódio e pectina e detectou-se também a presença de atividade de

Atividade Diminuidora da Viscosidade (mUV/ml)

Atividade Liberadora de Açúcar Redutor (mU/ml)

Atividade de Pectinesterase (ΔpH)

pectinesterase. As frações contendo atividade enzimática foram reunidas no pico I.

As frações (18 a 32), contendo atividade pectinolítica, reunidas no pico II, foram eluídas no tampão de equilíbrio (tampão A), o que sugere que as mesmas estavam fracamente adsorvidas à coluna. As atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor presentes no pico II, foram detectadas somente quando polipeptato de sódio foi empregado como substrato. Atividade de pectinesterase também foi observada neste pico.

As enzimas pectinolíticas adsorvidas à coluna foram eluídas com o aumento da força iônica do tampão A, por adição de concentrações crescentes de NaCl. As frações 36 a 43 (pico III) e as frações 46 a 54 (pico IV), eluídas por adição de 20 mM de NaCl ao tampão A, apresentaram atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor com quaisquer dos substratos utilizados. Atividade de pectinesterase foi detectada no pico III. Frações que apresentaram absorbância em 280 nm, sem atividade pectinolítica, foram eluídas quando adicionou-se 40 e 150 mM de NaCl ao tampão A.

A atividade pectinolítica presente nas frações 116 a 124 (pico V) foi eluída por adição de 300 mM de NaCl ao tampão A. O pico V apresentou atividade diminuidora da viscosidade com polipeptato de sódio e

pectina como substratos, mas a atividade liberadora de açúcar redutor foi detectada somente com polipectato de sódio. Nenhuma atividade de pectinesterase foi observada neste pico.

As atividades de pectina liase e pectato liase não foram detectadas no filtrado da cultura e nos picos enzimáticos quando avaliados pelo método descrito na seção 3.10.4.

Os dados de recuperação da atividade pectinolítica e o índice de purificação dos picos separados em coluna de DEAE-Sephacel estão apresentados na Tabela 8.

Os picos I e V apresentaram as maiores porcentagens de recuperação de atividade diminuidora da viscosidade (45,32 e 15,01% , respectivamente), quando avaliados com polipectato de sódio como substrato. As maiores porcentagens de recuperação de atividade diminuidora da viscosidade, empregando-se pectina como substrato, foram mostradas no pico I (22,62%), pico III (11,03%) e pico IV (13,31%).

Os maiores níveis de atividade liberadora de açúcar redutor foram recuperados nos picos I (32,68%) e II (19,71%) quando o polipectato de sódio foi empregado como substrato, enquanto que com pectina, as maiores recuperações dessa atividade ocorreram nos picos III (24,93%) e IV (28,16%).

Tabela 8. Sumário do processo de separação das enzimas pectinolíticas do filtrado de cultura de Penicillium frequentans em coluna de DEAE-SEPHACEL.

Passo	Volume (ml)	Proteína Total (mg)	Atividade Diminuidora da Viscosidade								Atividade Liberadora de Açúcar Redutor								Atividade de Pectinesterase			
			Total		Específica		Rendimento		Índice de		Total		Específica		Rendimento		Índice de		Total (UPE)	Específica (UPE/mg proteína)	Rendimento (%)	Índice de Purificação
			(UV)		(UV/mg proteína)		(%)		purificação		(U)		(U/mg proteína)		(%)		Purificação					
			NaPP	Pectina	NaPP	Pectina	NaPP	Pectina	NaPP	Pectina	NaPP	Pectina	NaPP	Pectina	NaPP	Pectina	NaPP	Pectina	NaPP	Pectina		
Filtrado	53	26,5	3,53	26,74	0,13	1,01	100,00	100,00	1,00	1,00	143,95	24,75	5,43	0,93	100,00	100,00	1,00	1,00	111,30	4,20	100,00	1,00
Pico I	62	6,2	1,60	6,05	0,26	0,98	45,32	22,62	2,00	0,97	47,04	2,87	7,59	0,46	32,68	11,59	1,40	0,49	42,16	6,80	37,88	1,62
Pico II	71	6,1	0,20	0,03	0,03	0,00	5,66	0,11	0,23	0,00	28,37	1,33	4,65	0,22	19,71	5,37	0,86	0,24	34,79	5,70	31,26	1,36
Pico III	40	3,4	0,14	2,95	0,04	0,87	3,97	11,03	0,31	0,86	21,06	6,17	6,19	1,81	14,63	24,93	1,14	1,95	7,60	2,23	6,83	0,53
Pico IV	45	3,5	0,18	3,56	0,05	1,02	5,10	13,31	0,38	1,01	15,15	6,97	4,33	1,99	10,52	28,16	0,79	2,14	0,00	0,00	0,00	0,00
Pico V	52	2,6	0,53	1,51	0,20	0,58	15,01	5,65	1,54	0,57	20,42	2,76	7,85	1,06	14,18	11,15	1,44	1,14	0,00	0,00	0,00	0,00
Total	-	21,8	2,65	14,10	0,58	3,45	75,06	52,72	-	-	132,04	20,10	30,61	5,54	91,72	81,20	-	-	84,55	14,73	75,97	-

Aproximadamente 76% da atividade de pectinesterase presente no filtrado foi recuperada nos picos I, II e III. Aproximadamente 75% da atividade diminuidora da viscosidade e 92% da atividade liberadora de açúcar redutor, presentes no filtrado, foram recuperadas nos picos enzimáticos, quando avaliadas com polipectato de sódio como substrato; enquanto que 53% da atividade diminuidora da viscosidade e 81% da atividade liberadora de açúcar redutor foram recuperadas nos picos enzimáticos, quando pectina foi empregada como substrato.

A atividade diminuidora da viscosidade apresentou o maior índice de purificação no pico I (2,0 vezes) quando o substrato era polipectato de sódio, e no pico IV (1,01 vezes) quando pectina era utilizada como substrato. A atividade liberadora de açúcar redutor, no entanto, apresentou maiores índices de purificação nos picos I (1,40 vezes) e V (1,44 vezes) utilizando-se como substrato, polipectato de sódio; e no pico IV (2,14 vezes) utilizando-se pectina como substrato; enquanto a maior purificação da atividade de pectinesterase foi obtida no pico I (1,62 vezes).

4.14. Cromatografia do pico I em coluna de CM-Celulose

O perfil de eluição da atividade pectinolítica presente no filtrado, em coluna de DEAE-

Sephacel, mostrou que pelo menos duas enzimas foram eluídas conjuntamente no pico I, o que tornou necessário uma recromatografia desse pico em coluna de CM-Celulose, conforme descrito na seção 3.9.2.

A recromatografia do pico I levou à separação de dois picos enzimáticos principais (pico I.2 e pico I.5) e outros picos com atividade pectinolítica menores (Figura 7).

O acompanhamento do processo cromatográfico foi realizado por medida das atividades diminuidora da viscosidade, liberadora de açúcar redutor e pectinesterase, avaliadas como descrito na seção 3.10. Absorbância em 280 nm não foi empregada devido à baixa concentração de proteína nas frações coletadas.

A atividade pectinolítica do pico I foi totalmente adsorvida à coluna. Os picos I.1 (frações 40 a 45) e I.2 (frações 49 a 56) foram eluídos em tampão B acrescido de 50 mM de NaCl e os picos I.3 (frações 64 a 66), I.4 (frações 69 a 74) e I.5 (frações 76 a 81) foram eluídos por adição de 150 mM de NaCl ao tampão B.

O pico I.1 mostrou atividade diminuidora da viscosidade com os substratos polipectato de sódio e pectina, mas não apresentou atividade liberadora de açúcar redutor, enquanto que o pico I.2 apresentou as atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor com ambos substratos. Atividade liberadora de açúcar

Figura 7. Cromatografia do pico I em coluna de CM - Celulose.

O pico I, obtido na cromatografia em DEAE - Sephacel, foi dialisado contra tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,0, contendo 1 mM de EDTA (tampão de equilíbrio) e aplicado à coluna de CM - Celulose (1,6 x 25 cm) equilibrada no mesmo tampão (fluxo de 33,5 ml/h e 5,6 ml/fração, a 25°C). O material adsorvido foi eluído por aumento da força iônica do tampão de equilíbrio, com NaCl nas concentrações indicadas, e o efluente da coluna foi analisado quanto a sua atividade pectinolítica sobre pectina (—) e polipeptato de sódio (---), conforme descrito na seção 3.10. (P = pico).

reductor foi detectada nos picos I.3 , I.4 e I.5 quando o substrato era polipectato de sódio, mas atividade diminuidora da viscosidade estava presente nos picos I.4 e I.5, somente quando pectina era o substrato da reação enzimática.

Atividade de pectinesterase foi detectada em todos os picos obtidos.

A Tabela 9 mostra os dados de recuperação e o índice de purificação do material eluído durante o processo cromatográfico do pico I, em coluna de CM-Celulose. As maiores porcentagens de recuperação das atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar reductor foram obtidas nos picos I.2 e I.5, independente do substrato utilizado. A maior recuperação da atividade de pectinesterase foi encontrada no pico I.1 (31,11%) e nos picos I.2 e I.4, com 18,17 e 18,23%, respectivamente.

A atividade diminuidora da viscosidade recuperada nos picos, procedentes desta cromatografia, correspondeu a 85,59 e 75,45% da atividade inicial, avaliada respectivamente, com polipectato de sódio e pectina, enquanto recuperou-se, respectivamente com os mesmos substratos, 129,43 e 107,23% da atividade liberadora de açúcar reductor inicial.

Os maiores índices de purificação das atividades diminuidora da viscosidade, liberadora de açúcar

Tabela 9. Sumário do processo de separação das enzimas pectinolíticas do pico I em coluna de CM-celulose.

Passo	Volume (ml)	Proteína Total (mg)	Atividade Diminuidora da Viscosidade								Atividade Liberadora de Açúcar Redutor								Atividade de Pectinesterase			
			Total (UV)		Específica (UV/mg proteína)		Rendimento (%)		Índice de purificação		Total (U)		Específica (U/mg proteína)		Rendimento (%)		Índice de Purificação		Total (UPE)	Específica (UPE/mg proteína)	Rendimento (%)	Índice de Purificação
			NaPP	Pectina	NaPP	Pectina	NaPP	Pectina	NaPP	Pectina	NaPP	Pectina	NaPP	Pectina	NaPP	Pectina	NaPP	Pectina				
Pico I	42,5	1,21	1,18	3,79	0,97	3,13	100,00	100,00	1,00	1,00	22,90	2,49	18,92	2,06	100,00	100,00	1,00	1,00	28,90	23,88	100,00	1,00
Pico I.1	31,0	0,35	0,04	0,14	0,11	0,40	3,39	3,69	0,11	0,13	1,69	0,26	4,83	4,83	7,38	10,44	0,25	2,34	8,99	25,68	31,11	1,07
Pico I.2	35,0	0,17	0,60	1,61	3,53	9,47	50,85	42,48	3,64	3,02	12,73	0,92	74,88	5,65	55,59	36,95	3,96	2,74	5,25	30,88	18,17	1,29
Pico I.3	17,5	0,15	0,06	0,03	0,40	0,20	5,08	0,79	0,41	0,06	1,83	0,40	12,20	2,67	7,99	16,06	0,64	1,30	0,87	5,80	3,01	0,24
Pico I.4	31,0	0,35	0,06	0,24	0,17	0,68	5,08	6,33	0,17	0,22	3,36	0,48	9,60	1,37	14,67	19,28	0,51	0,66	5,27	15,06	18,23	0,63
Pico I.5	30,0	0,15	0,25	0,84	1,67	5,60	21,19	22,16	1,72	1,79	10,03	0,81	66,87	4,07	43,80	24,50	3,53	1,98	1,50	10,00	5,19	0,42
Total	-	1,17	1,01	2,86	5,88	16,35	85,59	75,45	-	-	29,64	2,67	168,38	18,59	129,43	107,23	-	-	21,88	87,42	75,71	-

reductor e pectinesterase foram obtidos no pico I.2, com quaisquer dos substratos utilizados.

Resumidamente, a cromatografia da mistura enzimática produzida por *Penicillium frequentans*, cultivado nas condições adequadas anteriormente determinadas, em colunas de DEAE-Sephacel (Figura 6) e CM-Celulose (Figura 7), resultou na separação de seis picos principais com atividade pectinolítica. Nenhum deles apresentou atividade liase, provavelmente devido ao pH do meio de cultivo (pH 2,5) ser impróprio à produção desse tipo de atividade, a qual é geralmente produzida em pH básico, como já foi discutido anteriormente.

O processo de separação utilizado não proporcionou uma adequada separação da atividade desesterificante. A pectinesterase estava presente como contaminante em todos os picos com atividade depolimerizante, exceto nos picos IV e V, mostrando ser necessário um outro método de purificação para melhor separação dessas enzimas. A existência de vários picos de atividade de pectinesterase, sugere a formação de um complexo entre essas enzimas e as poligalacturonases, por serem liberadas juntas durante o processo cromatográfico, como foi verificado para pectinesterase e exopectato liase de *Clostridium multifementans* (ROMBOUTS & PILNIK, 1980). Pode também indicar a existência de isoenzimas, visto que LEONE & VAN DEN HEUVEL (1986) separaram 12 isoenzimas com

atividade poligalacturonase e 6 isoenzimas com atividade de pectinesterase, através de eletroforese do filtrado da cultura de *Botrytis cinerea* em gel de poliacrilamida contendo pectina.

Nas Tabelas 8 e 9, verifica-se que a recuperação das atividades diminuidora da viscosidade, liberadora de açúcar redutor e pectinesterase foram superiores a 75% das atividades originais aplicadas às colunas, e obteve-se um índice de purificação não superior a 4 vezes, o que indica que grande parte das proteínas presentes no filtrado da cultura eram enzimas pectinolíticas (somente um pico de absorbância em 280 nm sem atividade pectinolítica foi obtido na coluna de DEAE-Sephacel).

Talvez uma boa separação das enzimas pectinolíticas de *Penicillium frequentans* possa ser obtida, num único passo cromatográfico, por cromatografia de afinidade com polipectato, como foi constatado para os filtrados das culturas de *Botrytis cinerea* (MARCUS & SCHEJTER, 1983), *Geotrichum candidum* (BARASH *et alii*, 1984) e *Rhizoctonia solani* (MARCUS *et alii*, 1986).

4.15. Determinação do modo de ação das enzimas dos picos enzimáticos sobre o substrato polipectato de sódio: determinação do caráter endo ou exo

A Figura 8 apresenta a diminuição da viscosidade relativa da solução de polipectato de sódio comparada ao número de ligações glicosídicas hidrolisadas pelos principais picos enzimáticos, separados nos processos cromatográficos, em função do tempo de reação, conforme metodologia descrita na seção 3.11.1.1.

Na reação enzimática realizada com o pico I.2, verificou-se que no momento em que a viscosidade da solução do substrato (polipectato de sódio) atingiu a metade de seu valor inicial, apenas 3,3% das ligações glicosídicas haviam sido hidrolisadas. Quando uma diminuição de 50% da viscosidade foi observada devido à ação das enzimas dos picos I.5 e V, a quantidade de ligações glicosídicas clivadas correspondeu a 14 e 12,5%, respectivamente. Com as preparações enzimáticas dos picos II, III e IV, a mesma diminuição da viscosidade equivaleu respectivamente, à hidrólise de 69, 40 e 35% das ligações glicosídicas.

Como as enzimas dos picos I.2, I.5 e V hidrolisaram menos de 15% das ligações glicosídicas do substrato, enquanto a viscosidade era diminuída à metade do seu valor inicial, mostrou-se que essas enzimas clivam

Figura 8. Determinação do caráter endo ou exo dos picos enzimáticos separados pelo processo cromatográfico.

A reação enzimática foi realizada a 50°C, com 44 ml da solução de NaPP 2,0% em tampão acetato de sódio 25 mM, pH 4,0 e 4 ml de amostras dos picos enzimáticos. Aliquotas do meio de reação foram retiradas em intervalos de tempo definidos e avaliadas por diminuição da viscosidade relativa (—) e pelos grupos redutores liberados, expressos em porcentagem de ligações glicosídicas hidrolisadas (---). A liberação de 62 mM de ácido monogalacturônico correspondeu a 100% de hidrólise das ligações glicosídicas da solução de NaPP 2,0%. (P = pico).

preferencialmente as ligações internas da molécula do substrato e por isso foram caracterizadas como enzimas com atividade endo (segundo ROMBOUTS & PILNIK, 1972).

As enzimas dos picos II, III e IV, por apresentarem altas porcentagens de hidrólise das ligações glicosídicas, durante a diminuição de 50% da viscosidade, permitem sugerir que as mesmas hidrolisam, preferencialmente, ligações da extremidade da molécula do substrato, isto é, possuem atividade exo. Portanto, na separação das enzimas pectinolíticas em coluna de DEAE-Sephacel obtivemos três picos enzimáticos com caráter exo (picos II, III e IV) e um com caráter endo (pico V); e na recromatografia do pico I em coluna de CM-Celulose, os dois picos enzimáticos principais apresentaram caráter endo.

Os produtos resultantes da hidrólise do polipectato de sódio pelos picos enzimáticos, em função do tempo de reação, foram separados por cromatografia em camada delgada, conforme metodologia descrita na seção 3.11.1.2. e comparados à uma solução de ácido monogalacturônico padrão (Figura 9).

Nos produtos de hidrólise das reações onde as enzimas dos picos I.2, I.5 e V foram adicionadas, observa-se a presença de pequena quantidade de ácido monogalacturônico (pico I.5 e V) ou sua ausência (pico I.2) quando a viscosidade da solução de polipectato de sódio reduziu a metade da viscosidade inicial. Esses dados

Figura 9. Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise do polipeptato de sódio.

A solução de NaPP 2,0%, em tampão acetato de sódio 25 mM, pH 4,0, foi incubada a 50°C com as amostras dos picos enzimáticos. Amostras do meio de reação (20 µl) foram retiradas e aplicadas em placas (20x20 cm) com uma camada de 0,5 mm de sílica-G. O cromatograma foi desenvolvido por 4 horas com a mistura n-butanol, água destilada e ácido acético (5:3:2). A seguir, as placas foram secas em estufa a 50°C e reveladas com A) naftoresorcinol (10 mg) em etanol (5 ml) e ácido sulfúrico (0,1 ml) e secas a 50°C (picos I.2, I.5, III, IV e V) ou B) vanilina 1% em ácido sulfúrico concentrado e secas a 120°C (pico II). Os tempos indicados corresponderam a 50% de diminuição da viscosidade. Uma solução de ácido monogalacturônico 2 mg/ml (MGA) foi utilizada como padrão. (P = pico).

confirmam que as enzimas presentes nos picos são do tipo endo. A enzima do pico I.2. atua provavelmente por um mecanismo de ataque em múltiplas cadeias do substrato, enquanto que as enzimas dos picos I.5 e V, atuam provavelmente por um mecanismo de ataque múltiplo a uma única cadeia do substrato.

Nos produtos de hidrólise do polipectato de sódio pelas enzimas dos picos II, III e IV, detectou-se uma alta concentração de ácido monogalacturônico, que se refletiu na forma alongada das manchas do cromatograma quando a redução da viscosidade da solução de polipectato de sódio foi inferior a 50%. Os resultados sugerem que as enzimas dos picos II, III e IV apresentam atividade tipo exo.

4.16. Estudo sobre a especificidade das enzimas dos picos enzimáticos quanto ao substrato

A Figura 10 mostra a atividade das enzimas pectinolíticas, avaliadas pela liberação de grupos redutores das soluções dos substratos polipectato de sódio e pectina, em função do tempo de reação, conforme descrito na seção 3.11.2.

Os resultados mostraram que as enzimas de todos os picos apresentaram maior atividade liberadora de açúcar redutor, quando polipectato de sódio foi utilizado

Figura 10. Especificidade dos picos enzimáticos quanto ao substrato.

A reação enzimática foi realizada com soluções de pectina (---) e polipectato de sódio (—) como substratos, nos tempos indicados. Aliquotas das misturas de reação foram retiradas e analisadas quanto ao número de grupos redutores liberados, conforme descrito na seção 3.10.2. (P = pico).

como substrato. A hidrólise do polipectato de sódio pelas enzimas dos picos I.2 e I.5 foi respectivamente 4,6 e 7,0 vezes mais rápida do que sobre pectina, e a enzima do pico II hidrolisou, quase que exclusivamente, o polipectato de sódio. As enzimas dos picos III, IV e V foram menos específicas quanto ao substrato de reação; clivaram polipectato de sódio em velocidades respectivamente 1,8 , 2,3 e 1,9 vezes maiores do que nas reações com pectina.

Devido à ausência de atividade liase, verificada pelo método citado na seção 3.10.4., os picos enzimáticos obtidos do filtrado da cultura de *Penicillium frequentans* foram identificados como hidrolases, e baseados nos resultados apresentados nas seções 4.15. e 4.16., podemos então concluir que o fungo *Penicillium frequentans* produziu pelo menos três endopoligalacturonases, três exopoligalacturonases e pectinesterase, após 17 horas de cultivo, nas condições estabelecidas.

5. CONCLUSÕES

Na primeira parte deste estudo fez-se a otimização da produção de enzimas pectinolíticas por *Penicillium frequentans* cultivado nas condições padronizadas, e determinou-se que:

1. Os maiores níveis de atividade enzimática foram detectados nos filtrados das culturas suplementadas com 0,5% de pectina. Nas concentrações superiores a essa, a atividade pectinolítica decresceu.

2. O melhor pH inicial do meio de cultivo estava nos intervalos de 2,0 - 2,5 e 7,0 - 8,0.

3. A atividade pectinolítica atingiu os maiores níveis quando esporos obtidos de culturas com 10 dias foram utilizados para inocular o meio de cultivo na concentração de $5 \cdot 10^7$ esporos/ ml.

4. Os níveis de atividade diminuidora da viscosidade e atividade liberadora de açúcar redutor eram semelhantes a 30 e 35°C.

5. Os maiores níveis de atividade pectinolítica foram obtidos na 17ª hora de cultivo sob agitação, ou na 48ª hora em cultura estacionária.

Estudando os mecanismos regulatórios, verificou-se que:

6. Enzimas pectinolíticas foram produzidas em maiores níveis, nas culturas suplementadas com pectina, ácido poligalacturônico, " citrus pulp pellets " e ácido monogalacturônico, nesta ordem.

7. O "efeito glicose" foi produzido pela adição desse substrato, em concentração igual ou superior a 0,8%, ao meio de cultivo que já continha 0,8% de pectina.

Na caracterização do complexo pectinolítico, produzido nas condições ideais de cultivo, observou-se que:

8. Os valores das atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor foram maiores nas reações enzimáticas realizadas nas temperaturas de 55 e 50°C, respectivamente; e quando utilizou-se pectina em solução com pH entre 2,6 e 6,0.

9. As atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor eram bastante estáveis a 40°C, mas a 50°C, eram inativadas gradativamente, sendo que a atividade liberadora de açúcar redutor foi mais sensível ao tratamento térmico. As duas atividades apresentaram rápida inativação a 60°C.

10. As atividades diminuidora da viscosidade e liberadora de açúcar redutor mostraram-se bastante estáveis nos valores de pH entre 2,6 e 8,2.

Na separação e caracterização das enzimas pectinolíticas presentes no filtrado da cultura verificou-se que:

11. Por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel e CM-Celulose, obteve-se 6 picos enzimáticos principais com atividade depolimerizante. Atividade de pectinesterase não foi adequadamente separada e permaneceu como contaminante em alguns picos enzimáticos.

12. As enzimas de todos os picos foram identificadas como hidrolases.

13. Os picos I.2, I.5 e V apresentaram atividade do tipo endo, e os picos II, III e IV apresentaram atividade do tipo exo.

14. O substrato preferido pelos picos enzimáticos foi o polipectato de sódio.

15. O fungo *Penicillium frequentans* produziu pelo menos três endopoligalacturonases, três exopoligalacturonases e pectinesterase, nas condições ideais de cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGUILAR, G.; HUITRON, C. Application of fed-batch cultures in the production of extracellular pectinases by *Aspergillus sp.* *Enzyme Microbiol. Technol.*, v.9, p.541-5, sep. 1986.

AGUILAR, G.; HUITRON, C. Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus sp.* by galacturonic acid and glucose addition. *Enzyme Microbiol. Technol.*, v.9, n.11, p.690-6, nov. 1987.

ALANA, A.; GABILONDO, A.; HERNANDO, F.; MORAGUES, M.D.; DOMINGUEZ, J.B.; LLAMA, M.J.; SERRA, J.L. Pectin lyase production by a *Penicillium italicum* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.55, n.6, p.1612-6, jun. 1989.

BAILEY, M.J.; PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microbiol. Technol.*, v.12, n.4, p.266-71, apr. 1990.

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

- BARASH, I.; ZILBERMAN, E.; MARCÛS, 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.161-9, 1984.
- BYRDE, R.J.W.; WILLETTS, H.J. The brown rot fungi of fruit: Their biology and control. Oxford, Pergamon Press, 1977. p.171.
- CALL, H.P.; WALTER, J.; EMEIS, C.C. Maceration activity of an endopolygalacturonase from *Candida macedoniensis*. *J. Food Biochem.*, v.9, n.4, p.325-48, 1985.
- CLEVELAND, T.E.; Mc CORMICK, S.P. Identification of pectinases produced in cotton bolls infected with *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, v.77, n.11, p.1498-503, 1987.
- COLLMER, A. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathology*, v.24, p.383-409, 1986.
- CONWAY, W.S.; GROSS, K.C.; BOYER, C.D.; SAMS, C.E. Inhibition of *Penicillium expansum* polygalacturonase activity by increased apple cell wall calcium. *Phytopathology*, v.78, n.8, p.1052-5, 1988.

- CURTIS, P.J.; HEMMING, H.G.; SMITH, W.H. Frequetin: an antibiotic produced by some strains of *Penicillium frequentans* Westling. *Nature*, v.167, p.557-8, 1951.
- DAHODWALA, S.; HUMPHREY, A.; WEIBEL, M. Pectic enzymes: individual and concerted kinetic behavior of pectinesterase and pectinase. *J. Food Sci.*, v.39, p.920-6, 1974.
- DE CAL, A.; M-SAGASTA, E.; MELGAREJO, P. Antifungal substances produced by *Penicillium frequentans* and their relationship to the biocontrol of *Monilinia laxa*. *Phytopathology*, v.78, n.7, p.888-93, 1988.
- DEMAIN, A.L. Theoretical and applied aspects of enzyme regulation and biosynthesis in microbial cells. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, v.3, p.21-32, 1972.
- DEMAIN, A.L.; PHAFF, H.J. Hydrolysis of the oligogalacturonides and pectic acid by yeast polygalacturonase. *J. Biol. Chem.*, v.210, p.381-93, 1954.
- DEUEL, H.; STUTZ, E. Pectic substances and pectic enzymes. *Adv. Enzymol.*, v.20, p.341-82, 1958.
- DI LENNA, P.; FIELDING, A.H. Multiple forms of polygalacturonase in apple and carrot tissue infected by

- isolates of *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Microbiol.*, v.129, p.3015-8, 1983.
- DURRANDS, P.K.; COOPER, R.M. Development and analysis of pectic screening media for use in the detection of pectinase mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.28, n.4-5, p.463-7, 1988.
- FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Growth and polygalacturonase production by *Aureobasidium pullulans* on orange peel waste. *Microbiologie - Aliments - Nutrition*, v.3, p.39-46, 1985.
- FEDERICI, F.; MONTEDORO, G.; SERVILI, M.; PETRUCCIOLI, M. Pectic enzyme production by *Cryptococcus albidus* var. *albidus* on olive vegetation waters enriched with sunflower calathide meal. *Biol. Wastes*, v.25, n.4, p.291-301, 1988.
- FIEDUREK, J.; ILCZUK, Z.; LOBARZEWSKI, J. Influence of the mycelium growth conditions on the production of amylolytic, proteolytic and pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger* C. *Acta Biotechnol.*, v.9, n.4, p.355-61, 1989.
- FOGART, W.M.; KELLY, C.T. Pectic enzymes. In: Fogart, W.M., ed. Microbial enzymes and biotechnology. London, Applied Science Publishers, 1983. cap.3, p. 131-82.

- FONSECA, M.J.V.; SPADARO, A.C.C.; SAID, S. Separation of the components of pectolytic complex produced by *Tubercularia vulgaris* in solid state culture. *Biotechnol. Lett.*, v.13, n.1, p.39-42, 1991.
- FRIEDRICH, J.; CIMERMAN, A.; STEINER, W. Submerged production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: effect of different aeration/agitation regimes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.31, n.5-6, p.490-4, oct. 1989.
- FRIEDRICH, J.; CIMERMAN, A.; STEINER, W. Production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: effect of inoculum size and potassium hexacyanoferrate II - trihydrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.33, n.4, p.377-81, 1990.
- GILLESPIE, A.M.; COOK, K.; COUGHLAN, M.P. Characterization of an endopolygalacturonase produced by solid-state cultures of the aerobic fungus *Penicillium capsulatum*. *J. Biotechnol.*, v.13, n.4, p.279-92, 1990.
- HALL, J.A.; WOOD, R.K.S. The killing of plant cells by pectolytic enzymes. In: Byrde, R.J.W.; Cutting, C.V. Fungal pathogenicity and the plant's response. London, Academic Press, 1973.
- HEINRICHOVA, K.; REXOVA-BENKOVA, L. Purification and characterization of an extracellular exo-D-galacturonase

of *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta*, v.422, p.349-56, 1976.

HOURS, R.A.; VOGET, C.E.; ERTOLA, R.J. Apple pomace as raw material for pectinases production in solid-state culture. *Biol. Wastes*, v.23, n.3, p.221-8, 1988a.

HOURS, R.A.; VOGET, C.E.; ERTOLA, R.J. Some factors affecting pectinase production from apple pomace in solid state cultures. *Biol. Wastes*, v.24, n.2, p.147-57, 1988b.

JANSEN, E.F.; MAC DONNELL, L.R. Influence of methoxyl content of pectic substances on the action of polygalacturonase. *Arch. Biochem.*, v.8, p.97-112, jul. 1945.

KEEN, N.T.; HORTON, J.C. Induction and repression of endopolygalacturonase synthesis by *Pyrenochaeta terrestris*. *Can. J. Microbiol.*, v.12, p.443-53, 1966.

LARIOS, G.; GARCIA, J.M.; HUITRON, C. Endo-polygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043. *Biotechnol. Lett.*, v.11, n.10, p.729-34, 1989.

LEONE, G.; VAN DEN HEUVEL, J. Regulation by carbohydrates of the sequential *in vitro* production of pectic enzymes

- by *Botrytis cinerea*. *Can. J. Bot.*, v.65, n.10, p.2133-42, oct. 1987.
- LEUCHTENBERGER, A.; FRIESE, E.; RUTTLOFF, H. Variation of polygalacturonase and pectinesterase synthesis by aggregated mycelium of *Aspergillus niger* in dependence on the carbon source. *Biotechnol. Lett.*, v.11, n.4, p.255-8, 1989.
- LINEWEAVER, H.; JANSEN, E.F. Pectic enzymes. *Adv. Enzymol.*, v.11, p.267-95, 1951.
- LIU, Y.K.; LUH, B.S. Purification and characterization of endo-polygalacturonase from *Rhizopus arrhizus*. *J. Food Sci.*, v.43, p.721-6, 1978.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.F.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-75, 1951.
- LOZANO, P.; MANJON, A.; ROMOJARO, F.; IBORRA, J.L. Properties of pectolytic enzymes covalently bound to nylon for apricot juice clarification. *Process Biochem.*, v.23, n.3, p.75-8, jun. 1988.
- LYON, G.D.; SMITH, K.J.; HEILBRONN, J. The calcium requirement of polygalacturonic acid lyases produced by *Erwinia* spp. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.2, p.127-9, 1986.

- MALDONADO, M.C.; NAVARRO, A.; CALLIERI, D.A.S. Production of pectinases by *Aspergillus sp.* using differently pretreated lemon peel as the carbon source. *Biotechnol. Lett.*, v.8, n.7, p.501-4, 1986.
- MALDONADO, M.C.; CALLIERI, D.A.S. Influence of environmental conditions on the production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger*. *MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.5, n.3, p.327-33, 1989.
- MALDONADO, M.C.; STRASSER DE SAAD, A.M.; CALLIERI, D.A. Regulatory aspects of the synthesis of polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger sp.* *Sci. Alim.*, v.9, n.1, p.101-10, 1989.
- MANACHINI, P.L.; FORTINA, M.G.; PARINI, C. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *Biotechnol. Lett.*, v.9, n.3, p.219-24, 1987.
- MANACHINI, P.L.; PARINI, C.; FORTINA, M.G. Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. *Enzyme Microb. Technol.*, v.10, n.11, p.682-5, nov. 1988.
- MARCUS, L.; SCHEJTER, A. Single step chromatographic purification and characterization of the endopolygalacturonases and pectinesterases of the fungus

- Botrytis cinerea* Pers. *Physiol. Plant Pathol.*, v.22, p.1-13, 1983.
- MARCUS, L.; BARASH, I.; SNEH, B.; KOLTIN, Y.; FINKLER, A. Purification and characterization of pectolytic enzymes produced by virulent and hipovirulent isolates of *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, v.29, p.325-36, 1986.
- Mc CREADY, R.M. Pectin. In: Joslyn, M.A., ed. Methods in food analysis. New York, Academic Press, 1970. p. 565-99.
- MELGAREJO, P.; DE CAL, A.; M-SAGASTA, E. Influence of *Penicillium frequentans* and two of its antibiotics on production of stomata by *Monilinia laxa* in culture. *Can. J. Bot.*, v.67, n.1, p.83-7, 1989.
- MILL, P.J. The pectic enzymes of *Aspergillus niger*: a mercury - activated exopolygalacturonase. *Biochem. J.*, v.99, p.557-61, 1966.
- MILL, P.J.; TUTTOBELLO, R. The pectic enzymes of *Aspergillus niger*. 2. Endopolygalacturonase. *Biochem. J.*, v.79, p.57-64, 1961.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v.31, p.426-8, 1959.

- NASUNO, S.; STARR, M.P. Polygalacturonase of *Erwinia carotovora*. *J. Biol. Chem.*, v.241, n.22, p.5298-306, nov. 1966.
- NGUYEN-THE, C.; SOUTY, M.; BREUILS, L. Dégradation des substances pectiques de pêches par *Rhizopus stolonifer*. 2. étude *in vivo*. *Sci. Alim.*, v.5, p.639-52, 1985.
- NISHIO, N.; NAGAI, S. Production of macerating enzymes of mandarin orange peel by fungal cultures. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.6, p.371-8, 1979.
- PARINI, C.; FORTINA, M.G.; MANACHINI, P.L. Properties of two pectin lyases produced by *Aureobasidium pullulans* LV 10. *J. Appl. Bacteriol.*, v.65, p.477-81, 1988.
- PERLEY, A.F.; PAGE, O.T. Differential induction of pectolytic enzymes of *Fusarium roseum* (LK) emend. Snyder and Hansen. *Can. J. Microbiol.*, v.17, p.415-20, 1971.
- PETRUCCIOLI, M.; MONTELEONE, E.; FEDERICI, F. Optimization of polygalacturonase production by *Aureobasidium pullulans* on orange peel waste. *Yeast*, v.5, p.157-62, apr. 1989.
- PIFFERI, P.G.; PREZIUSO, M. Immobilization of endo-polygalacturonase on Γ -alumina for the treatment of fruit juices. *Lebensm. Wissen. Technol.*, v.20, n.3, p.137-42, 1987.

- PRUSKY, D.; GOLD, S.; KEEN, N.T. Purification and characterization of an endopolygalacturonase produced by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, v.35, n.2, p.121-33. aug. 1989.
- RAMIREZ, C. *Manual and atlas of the Penicillia*. Amsterdam, Elsevier Biomedical Press, 1982. p. 50-4.
- REXOVA-BENKOVA, L.; MRACKOVA, M. Active groups of extracellular endo-D-galacturonase of *Aspergillus niger* derived from pH effect on kinetic data. *Biochim. Biophys. Acta*, v.523, p.162-9, 1978.
- RIED, J.L.; COLLMER, A. Comparison of pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* subsp *carotovora*, and *Erwinia carotovora* subsp *atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.52, n.2, p.305-10, aug. 1986.
- ROMBOUTS, F.M.; PILNIK, W. Research on pectin depolymerases in the sixties - A literature review. *CRC Crit. Rev. Food Technol.*, v.3, p.1-26, apr. 1972.
- ROMBOUTS, F.M.; PILNIK, W. Pectic enzymes. In: Rose, A.H., ed. *Economic microbiology*, vol. 5: microbial enzymes and bioconversions. London, Academic Press, 1980. p. 227-82.

- ROMBOUTS, F.M.; PILNIK, W. Pectinases and other cell-wall degrading enzymes of industrial importance. *Symbiosis*, v.2, p.79-90, 1986.
- SAKAI, T.; TAKAOKA, A. Purification, crystallization and some properties of endo-polygalacturonase from *Aureobasidium pullulans*. *Agric. Biol. Chem.*, v.49, n.2 p.449-58, 1985.
- SCALA, A.; CAMARDELLA, L.; SCALA, F.; CERVONE, F. Multiple forms of polygalacturonase in two strains of *Rhizoctonia solani*. *J. Gen. Microbiol.*, v.116, p.207-11, 1980.
- SIËSSERE, 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.343-4, 1989.
- SPALDING, D.H. Production of pectinolytic and cellulolytic enzymes by *Rhizopus stolonifer*. *Phytopathology*, v.53, p. 923-31, 1963.
- SREENATH, H.K.; KOGEL, F.; RADOLA, B.J. Macerating properties of a commercial pectinase on carrot and celery. *J. Ferment. Technol.*, v.64, n.1, p.37-44, 1986.

STRATILOVA, E.; CAPKA, M.; REXOVA-BENKOVA, L.

Endopolygalacturonase immobilized on epoxide-containing supports. *Biotechnol. Lett.*, v.9, n.7, p.511-6, 1987.

STRZELCZYK, E.; DAHM, H.; KOWALSKY, S. The influence of pH and temperature on cellulolytic and pectolytic activity of *Cylindrocarpon destructans* (Zins) Scholt. *J. Phytopathology*, v.120, n.2, p.97-103, 1987.

TUTTOBELLO, R.; MILL, P.J. The pectic enzymes of *Aspergillus niger*. 1. The production of active mixtures of pectic enzymes. *Biochem. J.*, v.79, p.51-7, 1961.

WANG, M.C.; KEEN, N.T. Purification and characterization of endopolygalacturonase from *Verticillium albo-atrum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.141, n.2, p.749-57, 1970.

APENDICE

Resumo da classificação das enzimas pectinolíticas*.

Nome Recomendado	Nome Sistemático	E.C.	Substrato Preferido	Tipo de Clivagem	Mecanismo de Ação	Observações
Endopolimetilgalacturonase (endo-PMG)	Poli(metoxilgalactosiduronato) glicanohidrolase	3.2.1.41	pectina	hidrólise	endo	
Exopolimetilgalacturonase (exo-PMG)	Poli(metoxilgalactosiduronato) exohidrolase	---	pectina	hidrólise	exo	não encontrada
Endopolimetilgalacturonato liase (endo-PMGL) ou endopectina liase	Poli(metoxilgalactosiduronato) endoliase	4.2.2.10	pectina	trans-eliminação	endo	
Exopolimetilgalacturonato liase (exo-PMGL) ou exopectina liase	Poli(metoxilgalactosiduronato) exoliase	---	pectina	trans-eliminação	exo	não encontrada
Endopoligalacturonase (endo-PG)	Poli(1,4- α -D-galactosiduronato) glicanohidrolase	3.2.1.15	ácido péctico	hidrólise	endo	
Exopoligalacturonase (exo-PG1)	Poli(1,4- α -D-galactosiduronato) galacturonohidrolase	3.2.1.67	ácido péctico	hidrólise	exo	hidrolisa ligações sucessivas
Exopoligalacturonase (exo-PG2)	Poli(1,4- α -D-galactosiduronato) digalacturonohidrolase	3.2.1.82	ácido péctico	hidrólise	exo	hidrolisa ligações alternadas
Endopoligalacturonato liase (endo-PGL) ou endopectato liase	Poli(1,4- α -D-galactosiduronato) endoliase	4.2.2.2	ácido péctico	trans-eliminação	endo	
Exopoligalacturonato liase (exo-PGL) ou exopectato liase	Poli(1,4- α -D-galactosiduronato) exoliase	4.2.2.9	ácido péctico	trans-eliminação	exo	
Oligogalacturonase (OG)	Oligo-D-galactosiduronato hidrolase	---	oligo-D-galactosiduronatos	hidrólise	---	
Oligogalacturonato liase (OGL)	Oligo-D-galactosiduronato liase	4.2.2.6	oligo-D-galactosiduronatos	trans-eliminação	---	
Polimetilgalacturonato esterase (PMGE) ou pectinesterase (PE)	Pectina pectil-hidrolase	3.1.1.11	pectina	hidrólise	---	hidrolisa ligações ésteres com remoção de resíduos metoxil

* Modificado de FOGART & KELLY (1983).
E.C.= Enzyme Commission