**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E PRESERVAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES
DE PECTINASES**

SONIA APARECIDA REIS LOPES-SHIKIDA
Bióloga

Orientador: Prof^a Dr^a ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 1995

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS "LUIZ DE QUEIROZ"/USP

Lopes-Shikida, Sonia Aparecida Reis

Isolamento, seleção e preservação de fungos produtores de pectinases.

Piracicaba, 1995.

122p.

Diss.(Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Enzima pectolítica microbiana - Produção 2. Fungo - Isolamento

3. Fungo - Seleção I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
Piracicaba

DDO 576.11925

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E PRESERVAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES
DE PECTINASES**

SONIA APARECIDA REIS LOPES-SHIKIDA

Aprovada em 27/03/1995

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner ESALQ / USP

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo ESALQ / USP

Prof. Dr. Willibaldo Schimidell Neto Escola Politécnica / USP

Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner
Orientadora

**“ A vida é a arte de extrair conclusões
suficientes de premissas insuficientes.”**

Samuel Butler

**Aos meus pais, Francisco J. Lopes
e Maria R. S. Lopes e a meu
irmão Odair R. Lopes (*in memoriam*),**

DEDICO

**À minha família e, em especial, ao
meu marido, Pery F. Assis Shikida,
pelo seu amor, dedicação e por tudo
que representa em minha vida.**

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

. À **DEUS** e a **OSHIEOYÁ-SAMÁ**, pela oportunidade de participar de Sua Obra Criadora e por me ensinarem que a "Vida é Arte".

. À **Profa. Dra. Marina Vairo, Maria Regina Campos Mello e ao Prof. Dr. Flávio Althertum**, por terem propiciado o início desse caminho e pelo exemplo de confiança e respeito que aprendi a cultivar.

. À **Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner**, pelo apoio e orientação do presente trabalho.

. À **Dra. Clarita S. Perez** pela coordenação deste trabalho junto à FAPESP.

. À **Margaretti S. Oliveira e ao Prof. Dr. Antonio Bonomi** pelo apoio, incentivo e colaboração no que facilitou a realização deste trabalho.

. À **Luiziana F. da Silva**, pelo auxílio e pertinentes discussões durante os relatórios da FAPESP e durante a etapa de preservação das linhagens isoladas neste trabalho.

. À **Valter Fontolam**, pela disponibilidade e cooperação durante a preservação das linhagens.

. À **Fabiola Lorenzi e Marisa Seeder**, que participaram diretamente na parte experimental do presente trabalho e que, através de suas dedicação, colaboração e amizade, possibilitaram concluí-lo.

. Aos **Professores Dr. Willibaldo Schmidell Neto e Dr. Alfredo E. Maiorano**, pela colaboração e valiosas discussões durante o andamento deste trabalho.

- . À **Mônica Rosa Bertão**, pela revisão dos originais e as valiosas discussões, pelo estímulo e convivência nos momentos difíceis, pelo companheirismo e afeto com que compartilhou da minha trajetória de vida.
- . À **Renata C. Pascon**, pelo auxílio na reprodução fotográfica das pranchas e elaboração do *Summary* deste trabalho, pela convivência carinhosa, cuja presença amiga se fez marcante.
- . Ao **Prof. Dr. José S. Cunha Fernandes**, pela confecção das análises estatísticas, apoio e compreensão sempre constantes.
- . À **todos** os colegas do Departamento de Genética / ESALQ, em especial aos amigos João Pamphile, Marisa Vieira, Marcelo Vallim, Adriana Longo, Juliana Decico-Real, Salete Gaziola, pela oportunidade de um convívio enriquecedor.
- . Aos **docentes e funcionários** ligados ao curso de Pós-graduação do Departamento de Microbiologia Agrícola e Departamento de Genética da ESALQ, em especial ao **Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho** e a **bibliotecária "Bia"**, pelo apoio, compreensão e agradável convívio.
- . Ao **Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo**, em particular ao Agrupamento de Biotecnologia da Divisão de Química, onde foi desenvolvido este trabalho.
- . Aos **colegas** do Agrupamento de Biotecnologia do IPT que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.
- . À **FAPESP**, pelo apoio financeiro, no que possibilitou a realização do presente estudo.
- . Ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de estudos através do programa RHAE.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO.....	xvi
SUMMARY	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Substâncias pécticas (substrato)	3
2.2. Enzimas pectinolíticas.....	5
2.3. Produção de enzimas pectinolíticas.....	9
2.3.1. Fonte comercial de enzimas - aspectos gerais.....	9
2.3.2. Enzimas pectinolíticas e sua origem.....	10
2.3.3. Secreção de enzimas microbianas	11
2.3.4. Metabolismo microbiano de poligalacturonatos - (pectina).....	16
2.3.5. Controle da produção de enzimas microbianas - fatores que influenciam na produção.....	18
2.4. Importância e aplicação de enzimas pectinolíticas.....	23
2.5. Isolamento e seleção de fungos produtores de enzimas pectinolíticas	25
2.6. Preservação das linhagens fúngicas produtores de enzimas pectinolíticas	27

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Microrganismos utilizados.....	32
3.1.1. Isolados selvagens	32
3.1.2. Linhagens advindas de coleção de cultura.....	32
- <i>Aspergillus niger</i> NRRL 337	
- <i>A. niger</i> NRRL 3122	
- <i>A. niger</i> ATCC-1025 (IZ-150)	
- <i>A. awamori</i> AWG-547	
- <i>A. awamori</i> NRRL-3112	
- <i>Aspergillus oryzae</i>	
- <i>Aspergillus tamarai</i>	
3.2. Manutenção das linhagens e obtenção de esporos.....	33
3.3. Esterilização e incubação	33
3.4. Meios de cultura e soluções utilizadas	34
3.4.1. Meio Malt Extract Agar (Blakeslee's Form) - ATCC - 325 (ATCC Média handbook, 1984).....	34
3.4.2. Meio de Hankin (MH) - (Hankin & Anagnostakis, 1975)	34
3.4.3. Meio mínimo (Pontecorvo <i>et al.</i> , 1953)	35
3.4.4. Meio completo (Pontecorvo <i>et al.</i> , 1953, modificado por Azevedo & Costa, 1973).....	35
3.4.5. Solução de vitaminas	36
3.4.6. Solução tampão de McIlvaine (McIlvaine, 1921).....	36
3.4.7. Solução tampão acetato (Maiorano, 1990)	36
3.4.8. Solução salina.....	37
3.4.9. Solução "Tween 80" (0,01% V/V).....	37
3.4.10. Solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio (1%).....	37
3.4.11. Solução de pectina	37
3.4.12. Solução albumina 50%	38
3.4.13. Solução tampão fosfato pH 6.9 (0,2M).....	38
3.4.14. Solução de giemsa.....	38
3.4.15. Solução de desoxicolato de sódio (10% p/v)	39

3.5. Isolamento dos fungos pectinolíticos	39
3.5.1. Isolados do solo	39
3.5.2. Isolados de frutas.....	40
3.5.3. Nomenclatura utilizada para os isolados encontrados	40
3.6. Seleção dos isolados em placas (meio sólido)	40
3.7. Seleção dos isolados em cultura submersa.....	42
3.7.1. Produção de inóculo	42
3.7.2. Condições de fermentação	42
3.8. Cinética de crescimento e avaliação da atividade enzimática dos isolados selecionados.....	43
3.9. Acompanhamento analítico dos ensaios.....	43
3.9.1. Determinação do crescimento micelial	43
3.9.2. Avaliação da atividade enzimática.....	43
3.9.2.1. Método viscosimétrico.....	44
3.9.2.1.1. Procedimento	44
3.9.2.1.2. Cálculo da atividade enzimática	45
3.10. Caracterização dos isolados selecionados.....	47
3.10.1. Classificação dos isolados.....	47
3.10.2. Coloração de núcleos de conídios - Técnica citológica (Tanaka <i>et al.</i> 1979; modificado por Vega, 1990)	47
3.10.2.1. Preparo da lâmina.....	48
3.10.2.2. Determinação do número de núcleos por conídio	48
3.11. Preservação dos fungos pectinolíticos	48
3.11.1. Preservação por liofilização	48
3.11.2. Preservação em nitrogênio líquido	51
3.12. Sobrevivência à luz ultravioleta	51
3.12.1. Isolamento de mutantes morfológicos.....	52
3.12.2. Teste de reversão	52
3.13. Testes posteriores	52

3.14. Análises estatísticas	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Isolamento dos fungos	54
4.2. Seleção dos isolados quanto a produção de enzimas pécticas específicas	55
4.2.1. Seleção em placas (meio sólido)	56
4.2.2. Seleção em cultura submersa	68
4.3. Cinética de crescimento com avaliação da atividade enzimática das linhagens selecionadas	74
4.4. Caracterização das linhagens selecionadas	80
4.4.1. Classificação das linhagens	80
4.4.2. Caracterização citológica das linhagens	81
4.5. Determinação da redução de colônia pelo emprego de desoxicolato de sódio	84
4.6. Sobrevivência à luz ultravioleta	85
4.6.1. Obtenção de mutantes morfológicos	87
4.7. Seleção dos mutantes em cultura submersa	88
4.8. Cinética de crescimento com avaliação de atividade enzimática dos mutantes selecionados	91
4.9. Teste comparativo entre a cinética do mutante mais promissor e seu parental	101
4.10. Preservação das linhagens	104
5. CONCLUSÕES	109
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

LISTA DE TABELAS

1 - Classificação das enzimas pectinolíticas.	7
2 - Procedência dos isolados obtidos em diferentes coletas de solos e fontes naturais.	55
3 - Seleção dos isolados selvagens pelo método semiquantitativo (meio sólido), utilizando-se dois critérios de avaliação: Índice de Relação Enzimática (IRE) e Área de Degradação Enzimática (ADE). Os dados representam a média de 3 repetições, no tempo de 72 horas, as medidas em diâmetro ($\varnothing$) são dadas em cm.	57
4 - Análise de variância do parâmetro Índice de Relação Enzimática (IRE) analisado em meio sólido e resultados do Teste de Tukey para as linhagens fúngicas avaliadas (3 repetições).	62
5 - Análise de variância do parâmetro Área de Degradação Enzimática (ADE) analisado em meio sólido e resultados do Teste de Tukey para as linhagens fúngicas avaliadas (3 repetições).	64
6 - Seleção em cultura submersa das linhagens selvagens (medidas de atividade enzimática no tempo de 72 horas).	69
7 - Coeficiente de correlação simples entre pares de dados, utilizando as variáveis envolvidas na seleção em meio de cultura sólido (A e B) e em cultura submersa (C, D e E).	71
8 - Coeficiente de correlação simples entre pares de dados aplicados para os Índices: IC, IH e IUTMS e para parâmetros de avaliação na seleção em meio sólido (A e B) e em meio líquido (C e D).	73

9 - Dados de cinética de crescimento com avaliação da atividade enzimática dos isolados selvagens selecionados. Os valores representam a média de três experimentos independentes e seu desvio padrão	76
10 - Análise de variância da massa celular seca (mg) obtida pelas linhagens selvagens selecionadas FP/21, FP/42, FFP/46, FP/69, FP/76, FP/83 e pela linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados.	78
11 - Teste de Tukey para os valores médios da massa celular seca (mg) obtidos pelas linhagens selvagens selecionadas FP/21, FP/42, FP/46, FP/69, FP/76, FP/83 e pela linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados.	78
12 - Análise de variância da Unidade enzimática total (Utotal) obtida pelas linhagens selvagens selecionadas FP/21, FP/42, FP/46, FP/69, FP/76, FP/83 e pela linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizado..	79
13 - Teste de Tukey para os valores médios do parâmetro Utotal obtidos pelas linhagens selvagens selecionadas FP/21, FP/42, FP/46, FP/69, FP/76, FP/83 e pela linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados..	79
14 - Classificação taxonômica dos isolados selvagens selecionados	80
15 - Frequência de núcleos por conídios das linhagens selvagens selecionadas.....	81
16-Redução do diâmetro de colônias de <i>Trichoderma harzianun Rifai</i> , crescidas em meio completo (os dados constituem média de três repetições e estão expressos em cm).	84
17 - Porcentagem de sobrevivência dos conídios de <i>Trichoderma harzianum Rifai</i> após exposição à luz ultravioleta (os dados constituem média de três repetições).	86
18 - Mutantes morfológicos, resultantes do tratamento de conídios da linhagem <i>Trichoderma harzianum Rifai</i> (FP/83), com luz ultravioleta, no tempo de exposição de 4 minutos e 45 segundos.	88

- 19 - Seleção em cultura submersa dos mutantes morfológicos provenientes da linhagem de *Trichoderma harzianum* Rifai FP/83 (medidas no tempo de 72 horas). 90
- 20 - Dados da cinética de crescimento com avaliação da atividade pectinolítica dos mutantes morfológicos selecionados, comparados ao parental FP/83. Os valores representam a média de três experimentos independentes e seu desvio padrão. 92
- 21 - Análise de variância da massa celular seca (mg) obtida pelas linhagens mutantes selecionadas 1/4, 1/9, 2/3, 6/1 e pela linhagem parental FP/83, nos ensaios cinéticos realizados. 95
- 22 - Teste de Tukey para os valores médios da massa celular seca (mg) obtida pelas linhagens mutantes selecionadas 1/4, 1/9, 2/3, 6/1 e pela linhagem parental FP/83, nos ensaios cinéticos realizados. 95
- 23 - Análise de variância da Unidade enzimática total (Utotal) obtida pelas linhagens mutantes selecionadas 1/4, 1/9, 2/3, 6/1 e pela linhagem parental FP/83, nos ensaios cinéticos realizados. 96
- 24 - Teste de Tukey para os valores médios do parâmetro Utotal obtido pelas linhagens mutantes selecionadas 1/4, 1/9, 2/3, 6/1 e pela linhagem parental FP/83, nos ensaios cinéticos realizados. 96
- 25 - Análise de variância da massa celular seca (MS), obtida pelas linhagens selvagens selecionadas FP/83, FP/69 e pelos mutantes de FP/83: 1/4, 1/9, 2/3, 6/1, e linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados. 98
- 26 - Teste de Tukey para as médias de massa celular seca, obtido pelas linhagens selvagens selecionadas FP/83, FP/69 e pelos mutantes de FP/83: 1/4, 1/9, 2/3, 6/1, e linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados. 98
- 27 - Análise de variância da Unidade Enzimática Total (Utotal), obtida pelas linhagens selvagens selecionadas FP/83, FP/69, e pelos mutantes de

FP/83: 1/4, 1/9, 2/3, 6/1, e linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados.	99
28 - Teste de Tukey para as médias do parâmetro U_{total} , obtido pelas linhagens selvagens selecionadas FP/83, FP/69, e pelos mutantes de FP/83: 1/4, 1/9, 2/3, 6/1, e linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados.	99
29 - Análise de variância para o Índice clássico de Smith (IC), obtido pelas linhagens selvagens selecionadas FP/83, FP/69, e pelos mutantes de FP/83: 1/4, 1/9, 2/3, 6/1, e pela linhagem padrão FP/107 nos ensaios cinéticos realizados.	100
30 - Teste de Tukey para médias do parâmetro de seleção (IC), obtido pelas linhagens selvagens selecionadas FP/83, FP/69, e pelos mutantes de FP/83: 1/4, 1/9, 2/3, 6/1, e pela linhagem padrão FP/107 nos ensaios cinéticos realizados.	100
31 - Cinética comparativa da linhagem selvagem FP/83 e seu mutante 1/4	102
32 - Viabilidade de culturas fúngicas (Ufc/ml) submetidos à liofilização (os valores representam a média de três repetições).	106
33 - Viabilidade de esporos fúngicos (Ufc/ml) submetidos à liofilização. Cada valor é média de três repetições.	106
34 - Viabilidade dos esporos das linhagens fúngicas isoladas neste trabalho e mantidas por criopreservação em nitrogênio líquido (Ufc/ml).	107
35 - Acompanhamento da produção de enzimas através da medida do IRE* das linhagens fúngicas liofilizadas.	108
36 - Acompanhamento da produção de enzimas através da medida do IRE* das linhagens fúngicas mantidas por criopreservação.....	108

LISTA DE FIGURAS

1 - Esquema da molécula de pectina e do modo de ação das enzimas pectinolíticas.	6
2 - Secreção co-traducional de proteína bacteriana.	12
3 - A secreção e processamento de enzimas em eucariotos.	13
4 - Representação diagramática de estruturas típicas de parede celular....	15
5 - Via metabólica do ácido poligalacturônico em bactéria.	17
6 - Síntese enzimática como uma função do crescimento microbiano.	20
7 - Esquema para o processo de liofilização.	50
8 - Cinética de crescimento com avaliação da atividade enzimática dos isolados selvagens selecionados.	77
9 - Linhagem FP/21 - conídios ovais uninucleados, normalmente em forma de correntes e núcleos bem acentuados (a); Linhagem FP/42 - conídios redondos de parede ornamentada, uni e binucleados (b), Linhagem FP/46 - conídios redondos, uni e binucleados (c); Linhagem FP/69 - conídios redondos irregulares, uni e binucleados (d). Aumento de 1.500x.	82
10 - Linhagem FP/76 - conídios redondos, uni e binucleados (a); Linhagem FP/83 - conídios ovais uninucleados, núcleos acentuados (b); Linhagem FP/107 - conídios grandes multinuclear arredondados, de parede levemente ornamentada (c). Aumento de 1500x.	83
11 - Curva de sobrevivência dos conídios da linhagem de <i>Trichoderma harzianum</i> Rifai (FP/83) após exposição à luz ultravioleta.	86
12 - Cinéticas de crescimento com avaliação da atividade enzimática dos mutantes morfológicos selecionados, comparadas ao parental (FP/83) e a linhagem padrão (FP/107).	94
13 - Cinética de crescimento com avaliação da atividade enzimática do mutante (1/4) e seu parental (FP/83).	104

LISTA DE ABREVIATURAS

UV - Ultravioleta

C/N - Relação Carbono/Nitrogênio

U - Unidade enzimática

Utotal - Unidade enzimática total

Uesp - Unidade enzimática específica

ISOLAMENTO, SELEÇÃO E PRESERVAÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE PECTINASES

Autora: Sonia A. Reis Lopes-Shikida

Orientador: Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner

RESUMO

O presente trabalho foi realizado como parte de uma linha de pesquisa desenvolvida no Agrupamento de Biotecnologia, Divisão de Química - IPT, visando basicamente o isolamento e seleção de linhagens fúngicas melhores produtoras de enzimas pectinolíticas, bem como a preservação adequada de tais linhagens.

O complexo enzimático em foco neste trabalho é composto por enzimas que degradam substâncias pécticas. As enzimas pectinolíticas são produzidas por vários microrganismos. Entretanto, para fins industriais, somente os de origem fúngica são utilizados. Tais enzimas têm sido largamente empregadas na indústria de processamento de frutas para maceração de polpas, extração e clarificação de sucos e vinhos.

Linhagens interessantes do ponto de vista industrial nem sempre são encontradas a disposição em coleções de cultura, tomando-se premente o desenvolvimento de trabalhos que visem a busca de novos isolados com características satisfatórias para a produção do metabólito de interesse. Assim sendo, é também essencial que as linhagens promissoras encontradas sejam mantidas adequadamente para preservação de suas importantes características originais, justificando-se dessa forma o presente estudo.

Para obtenção de novos isolados da natureza, utilizou-se técnicas microbiológicas básicas de isolamento. Na seleção utilizou-se testes semiquantitativos (meio sólido) e quantitativos (meio líquido). Os testes aplicados refletiram em algumas distorções, que podem ser peculiares a cada

método. Através destes, foi possível selecionar a linhagem FP/83, posteriormente classificada como *Trichoderma harzianum* Rifai, que produz 2,5 vezes mais enzima que a linhagem padrão utilizada, FP/107 de *Aspergillus oryzae*.

Mutantes morfológicos provenientes da linhagem FP/83 foram obtidos através da indução de seus conídios com luz ultravioleta. Para seleção dos mutantes encontrados utilizou-se apenas do teste quantitativo (meio de cultura líquido). Dentre estes, o mutante 1/4 demonstrou sua superioridade quanto a produção de pectinases, sendo aproximadamente 2,5 vezes melhor que seu parental (FP/83) e cerca de 5,0 vezes a linhagem padrão (FP/107).

Os métodos de preservação, como liofilização e criopreservação em nitrogênio líquido, aplicados para as linhagens selecionadas demonstraram-se bastante adequados, refletindo-se na manutenção da viabilidade celular a níveis bastantes elevados para a maioria das linhagens.

ISOLATION, SELECTION AND PRESERVATION OF PECTINOLYTIC FUNGI

Author: Sonia A. Reis Lopes-Shikida

Advisor: Profa. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner

SUMMARY

The present work was conducted as part of research program developed at Biothecnology Department IQ/IPT, the aim was to isolate and select fungi strains best producer of pectinolytic enzymes, and the suitable way to preserve them. The pectinolytic complex studied in this work is composed of enzymes which are able to degrade pectinolytic materials. These enzymes are produced by many microorganisms, but for industry purposes only fungi enzymes are employed. They are widely used on fruit processing industry, for pulp maceration, extraction and clarification of juice and wine. Interesting industrial strains are not always available in culture collections, so searching for new strains with suitable characteristics for interesting metabolites production are necessary. In this way, it is essential for the strains selected to be preserved, keeping original and important characteristics, justifying the present work. New isolates from nature were obtained employing basic microbiology techniques. To select them, tests such as quantitative (solid medium) and qualitative (liquid medium) were performed. They showed particular results. These tests were suitable to select the strain FP/83, that later was classified as *Trichoderma harzianum* Rifai which is able to produce 2,5 times more enzyme than the standard strain, *Aspergillus oryzae*, FP/107. Conidia of FP/83 were irradiated with U.V. light in order to get morphology mutants which were selected employing quantitative test (liquid medium). The mutant 1/4 was isolated showed a producing increase of 2,5 times more than the parental strain and four folds than the standard strain FP/107 for 120 hours of fermentation. Concerning the preservation of these selected strains, lyophilisation and cryopreservation showed to be adequate. The maintenance of viability was verified to be high for almost all strains.

1. INTRODUÇÃO

Os estudos de produção, bem como a utilização de enzimas por diferentes métodos tem se tornado um importante setor industrial na Biotecnologia. Tal setor tem apresentado taxas de crescimento bastante elevadas, variando de 10 a 17% ao ano entre 1980 e 1985, com volume de mercado mundial em torno de US\$ 700 milhões (MAIORANO, 1987).

Atualmente já foram identificadas e caracterizadas mais de 2.500 enzimas, das quais cerca de 300 são comercializadas em pequenas quantidades e cerca de 50 têm sido obtidas em quantidades suficientes para uso em escala industrial. Nesse contexto, as hidrolases têm apresentado uma posição de destaque em relação às demais enzimas (GODFREY, 1986). Dentre estas as pectinases foram escolhidas como objeto de estudo no presente trabalho.

As enzimas pectinolíticas são produzidas por plantas e microrganismos, principalmente bactérias e fungos filamentosos, e alguns protozoários e leveduras. O complexo pectinolítico é composto por enzimas que degradam substâncias pécticas. Tais enzimas são largamente usadas na indústria de processamento de frutas para maceração de polpas, extração e clarificação de sucos e de vinhos, sendo usada para esta finalidade somente as enzimas de origem fúngica. A clarificação de sucos é um dos maiores campos de aplicação das pectinases, principalmente para sucos de maçã, uva e pêra (SIÉSSERE, 1991).

Apesar do grande progresso alcançado a nível mundial, a enzimologia no Brasil ainda apresenta um desenvolvimento insuficiente. Embora exista no país uma pequena capacitação tecnológica para a produção de algumas hidrolases, pouco se investe em áreas fundamentais para tal desenvolvimento, tais como manutenção de bancos de microrganismos

produtores de enzimas, processos de recuperação, purificação e concentração de enzimas, e procedimentos para ampliação de escala (MAIORANO, 1991).

A produção de enzimas microbianas está fundamentalmente ligada a três etapas: seleção do microrganismo, processo de fermentação e recuperação do produto. O desenvolvimento do processo de produção em escala industrial de uma enzima, com qualidade satisfatória e a custos que permitam sua comercialização, não é muito simples de ser alcançado. Para tal, é necessário que se encontre uma combinação ótima entre a linhagem de microrganismo, meio de cultura, processo de fermentação e os métodos de recuperação do produto (BARFORD, 1981).

Desta forma, pelas razões apontadas, justifica-se o trabalho que vem sendo realizado no Agrupamento de Biotecnologia da Divisão de Química do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. - IPT, visando o desenvolvimento de processos de produção de enzimas pectinolíticas a nível industrial e a conseqüente capacitação de pessoal para a área de enzimologia.

As constatações acima relacionadas indicaram a importância da realização do presente trabalho que objetivaram principalmente:

- a) Isolamento de fungos de fontes naturais, produtores de pectinases;
- b) Seleção de linhagens produtoras de pectinases;
- c) Identificação das linhagens selecionadas;
- d) Preservação das linhagens produtoras de pectinases.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Substâncias pécticas (substrato)

Os polissacarídeos celulose, hemicelulose e pectina, são os 3 principais componentes da parede celular de plantas (GOODENOUGH, 1991). As substâncias pécticas são encontradas, principalmente, na lamela mediana e parede celular primária de muitas plantas superiores. Estão presentes em quantidades geralmente não excedentes a 1% da massa da planta, em peso fresco (Doesburg, 1965 & Kawabata, 1977 citados por ROMBOUTS & PILNIK, 1980), sendo responsáveis pela integridade e aderência dos tecidos da planta, ou seja, apresentam grande influência tanto na consistência, como no aparecimento e estabilização de turvação em sucos de frutas e vegetais. Assim sendo, a textura das plantas e vegetais é muito influenciada pela quantidade e natureza das substâncias pécticas presentes. A maioria dessas substâncias em frutos verdes está na forma de protopectina, a qual é transformada em pectina solúvel durante a maturação (FOGART & KELLY, 1983).

Estas substâncias, em sua forma natural são heteropolissacarídeos de peso molecular entre 30.000 a 300.000, consistindo de uma cadeia principal formada por unidades do ácido α -D-galacturônico com ligações de α -1,4.

Numa designação mais genérica, as substâncias pécticas foram denominadas como derivados coloidais de carboidratos, porque o ácido galacturônico em vegetais é derivado da galactose via oxidação do grupo alcoólico do carbono 6. Há grande proporção de unidades de ácido anidro galacturônico, formando uma cadeia polimérica.

Os grupos carboxila do ácido poligalacturônico podem ser encontrados parcialmente esterificados com grupos metil ou completamente neutralizados por uma ou mais bases. O grau de esterificação varia com a

procedência da pectina. Pequenas quantidades de resíduos de L-ramopirranose estão ligadas no C-1 e C-2 da cadeia principal. Algumas hidroxilas do C-2 ou C-3 podem estar acetiladas, existindo valores de acetilação que variam de 0,2% no caso da pectina cítrica e de maçã, e de 2 a 4% em pectina do bagaço de beterraba. Cadeias laterais de açúcares neutros, principalmente galactose, arabinose e xilose, encontram-se covalentemente ligadas ao C-2 e C-3 da unidade monomérica (Fogarty & Ward, 1974, Rombouts & Pilnik, 1980, Fogarty & Kelly, 1983, *apud* MAIORANO, 1990 e SIESSÉRE, 1991).

Em meados da década de 40, em vista das controvérsias existentes a respeito da nomenclatura das substâncias pécticas, um comitê da "American Chemical Society" apresentou várias definições para estas complexas substâncias, recebendo a seguinte classificação:

- . Protopectina - é a substância original do grupo de substâncias pécticas que ocorrem em plantas; é insolúvel em água e sob hidrólise parcial produz ácidos pectínicos;
- . Ácidos pectínicos - são ácidos poligalacturônicos coloidais, contendo uma pequena proporção de grupos metil ésteres. Estes ácidos em condições apropriadas são capazes de formar géis com açúcares e ácido;
- . Pectinas - são os ácidos pectínicos solúveis em água, de cujo conteúdo de metil ésteres e grau de neutralização são variáveis. Também são capazes de formar géis com açúcares e ácidos, sob condições adequadas.
- . Ácido péctico - nome dado a substâncias pécticas compostas, principalmente de ácidos poligacturônicos coloidais e essencialmente livres de metoxilação. Os sais de ácidos pécticos são pectatos neutros ou ácidos.

2.2. Enzimas pectinolíticas

As enzimas, catalisadores de reações biológicas, representam um importante papel no setor da indústria de alimentos. As enzimas pectinolíticas, devido a sua capacidade de atuar na degradação de polissacarídeos pécnicos, constituem-se num grupo de enzimas de relevante importância, apresentando diferentes mecanismos de ação.

A degradação completa da parede celular de vegetais, normalmente é realizada por uma grande variedade de enzimas nas quais as pectinases estão incluídas (GOODENOUGH, 1991).

O termo pectinase é frequentemente aplicado para misturas brutas de enzimas pectinolíticas. Estas são classificadas segundo seu modo de ação na estrutura poligalacturônica (Figura 1) da molécula da substância pécica. De acordo com o modo de ação dessas enzimas, elas foram classificadas em dois tipos distintos: enzimas desesterificantes e despolimerizantes (PARK & PAPINI, 1968, ROMBOUTS & PILNIK, 1980, FOGART & KELLY 1983). Ao primeiro grupo pertencem as pectinesterases (PE), as quais catalisam a remoção dos grupos metílicos da molécula de pectina, produzindo álcool metílico e ácidos pectínicos até pécnicos, expondo os grupamentos carboxílicos à ação de cátions multivalentes como o cálcio. Essa ação dá origem a sais insolúveis, que facilmente podem ser removidos (PARK & PAPINI, 1968 e ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

As enzimas do tipo despolimerizantes catalisam a quebra das ligações α -1,4 da cadeia principal do polissacarídeo pécico, ou seja, quebram as ligações glicosídicas por hidrólise (hidrolases) ou por β -eliminação (liases).

Figura 1: Esquema da molécula de pectina e do modo de ação das enzimas pectinolíticas: polimetilgalacturonase (PMG), poligalacturonato liase (PMGL), pectinesterase (PE), poligalacturonase (PG) e poligalacturonato liase (PGL).
Fonte: ROMBOUITS & PILNIK (1980).

Segundo ROMBOUTS & PILNIK (1980), tais enzimas podem ser caracterizadas, levando-se em conta alguns aspectos tais como:

- a) tipo de substrato - (pectina, ácido pécico ou oligo -D-galacturonatos);
- b) tipo de clivagem - (ataque por hidrólise ou trans-eliminação);
- c) mecanismo de ação enzimática - (atuação sobre a molécula do substrato, por clivagem de ligações glicosídicas ao acaso no interior da molécula (endoatividade) ou por clivagem de ligações terminais (exo-atividade)).

Em função destes aspectos, as enzimas desesterificantes e despolimerizantes, foram classificadas conforme mostrado na Tabela 1.

TABELA 1 - Classificação das enzimas pectinolíticas

ESTERASES

Pectinesterase (PMGE), EC 3.1.1.11, desesterifica pectina para ácido pécico por remoção de resíduos metoxil.

n.s(*) ; Pectina pectil-hidrolase

n.r(**) ; Polimetilgalacturonase esterase

DESPOLIMERASES

1. Ação sobre pectina

1.1. Polimetilgalacturonase (PMG)

a) Endo-PMG hidrolisa pectina ao acaso

n.s. : Polimetoxilgalactosiduronato glicanohidrolase

n.r. : Endopolimetilgalacturonase

b) Exo-PMG hidrolisa pectina passo a passo

n.s. : Polimetoxilgalactosiduronato exohidrolase

n.r. : Exopolimetilgalacturonase

1.2. Polimetilgalacturonase liase (PMGL)

a) Endo-PMGL, EC 4.2.2.10, ataca a pectina ao acaso por β -eliminação

n.s. : Polimetoxilgalactosiduronato endo liase

n.r. : Endopolimetilgalacturonato liase
(endo pectina liase)

b) Exo-PMGL causa a quebra da pectina sequencialmente por β -eliminação

n.s. : Polimetoxilgalactosiduronato exo-liase

n.r. : Exopolimetilgalacturonato liase

continua...

Tabela 1 (continuação)

2. Ação em ácido péctico (ácido poligalacturônico)

2.1. Poligalacturonase (PG)

a) Endo-PG, 3.2.1.15, hidrolisa ao acaso o ácido péctico

n.s. : Poli (1,4 - α -D-galactosiduronato)
glicanohidrolase

n.r. : Endopoligalacturonase

b) Exo-PG-1, EC 3.2.1.67, Hidrolisa sequencialmente o ácido péctico liberando D-galacturonatos

n.s. : Poli (1,4 - α -D-galactosiduronato)
galacturonohidrolase

n.r. : Exopoligalacturonase

c) Exo-PG-2, EC 3.2.1.82, hidrolisa o ácido péctico a partir do terminal não redutor, produzindo digalacturonatos

n.s. : Poli (1,4 - α -D-galactosiduronato)
digalacturonohidrolase

n.r. : Exopolidigalacturonase

2.2. Poligalacturonase liase (PGL)

a) Endo-PGL, EC 4.2.2.2., causa a quebra do ácido péctico por β -eliminaçãon.s. : Poli (1,4 - α -D-galactosiduronato) endo
liasen.r. : Endopoligalacturonato liase (endopectato
liase)b) Exo-PGL, EC 4.2.2.9, causa a quebra sequencial do ácido péctico por β -eliminaçãon.s. : Poli (1,4 - α -D-galactosiduronato) exo liase

n.r. : Exopoligalacturonato liase (exopectato liase)

3. Ação em oligo-D-galactosiduronatos

3.1. Oligogalacturonase (OG)

OG hidrolise oligo-D-galactosiduronatos

n.s. : Oligo-D-galactosiduronato hidrolase

n.r. : Oligogalacturonase

3.2. Oligogalacturonato liase (OGL)

OGL, EC 4.2.2.6, causa a quebra de oligo-D-galactosiduronatos por β -eliminação

n.s. : Oligo-D-galactosiduronatos liase

n.r. : Oligogalacturonato liase

(*) n.s. = nome sistemático

(**) n.r. = nome recomendado

Fonte: FOGART & KELLY (1983).

2.3. Produção de enzimas pectinolíticas

2.3.1. Fonte comercial de enzimas - aspectos gerais

Tradicionalmente as enzimas industriais são obtidas a partir de três fontes principais, quais sejam: animais superiores (por ex. pepsina, catalase, renina, etc.), vegetais superiores (por ex. papaína, bromelina, etc) e microrganismos (por ex. amilases, proteases, pectinases, invertase, celulase, etc.).

Tais enzimas, são produzidas por uma diversidade considerável de microrganismos, como por exemplo: *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces fragilis*, *Erwinia carotovora*, *Bacillus mesentericus*, dentre outros (PARK, 1970).

As enzimas provenientes de animais são consideradas como subprodutos da indústria de carne, portanto, de produção limitada. Aquelas provenientes de vegetais requerem o crescimento de uma grande quantidade de matéria vegetal para a produção de uma quantidade relativamente pequena de enzima, o que é, do ponto de vista econômico, pouco interessante (PARK & PAPINI, 1968).

Por outro lado, as enzimas de origem microbiana não apresentam limitação do ponto de vista tecnológico, possibilitando ao produtor um maior controle em sua capacidade produtiva, já que os microrganismos apresentam crescimento relativamente rápido e fácil em meio de cultura. Além disso, níveis enzimáticos podem ser aumentados por manipulações genéticas ou alterações nas condições de cultivo, com maior facilidade se comparado com as de origem animal e vegetal (GASEA & HUBBLE, [198-]). Portanto, por várias razões de ordem técnica e econômica, os microrganismos, particularmente aqueles que secretam enzimas, constituem-se nos organismos preferidos da indústria de enzimas (HOLLAND *et al.*, 1986).

2.3.2. Enzimas pectinolíticas e sua origem

Diante do exposto anteriormente, torna-se mais evidente a preferência por fontes microbianas para produções de enzimas, somando-se o fato de que os microrganismos em princípio podem fornecer quaisquer enzimas análogas àquelas de origem vegetal ou animal (VITOLLO, 1981).

Muitas das enzimas utilizadas atualmente nas indústrias de alimentos se enquadram dentro da categoria hidrolítica. Estas enzimas caracteristicamente despolimerizam seus substratos em pequenos oligômeros e/ou monômeros (KLACICK, 1988). Entre os vários exemplos que poderiam ser citados, as pectinases serão destacadas por serem foco deste trabalho.

Tais enzimas, tem sido produzidas em muitos países por uma grande variedade de microrganismos, onde as espécies mais utilizadas são: *N. crassa*, *A. niger*, *Penicillium sp*, *Rhizopus sp*, *Bacterium aeroides*, *S. fragilis*, *Pseudomonas prunicole*, *Sclerotinia libertiana*, *Candida subtilis*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma sp*, entre outros (LIMA et al., 1975).

Apesar das pectinases serem produzidas por muitas espécies de fungos, bactérias e algumas leveduras, existem limitações legais para a aplicação de enzimas microbianas na tecnologia de alimentos. Somente são aceitas enzimas derivadas de microrganismos tradicionalmente conhecidos na fermentação de alimentos, pois estes microrganismos comprovadamente não são patogênicos aos seres humanos, sendo então denominados classe GRAS ("Generally Recognized as Safe") (ROMBOUTS & PILNIK, 1986).

Neste contexto, esta é provavelmente a principal razão pela qual as pectinases comerciais, sejam em sua maioria produzidas por fungos filamentosos, representados pelo gênero *Aspergillus*. As espécies mais usadas para a produção dessas enzimas em escala industrial, são: *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae* e *Penicillium sp*. (Estados Unidos); *Aspergillus foetidus* (Inglaterra); *Aspergillus niger* (Suíça); *Aspergillus aureus* (Alemanha); *Sclerotinia libertiana* e *Coriothyrium diplodiella* (Japão), (ENDO, 1962). A preferência pelo gênero *Aspergillus*, talvez se deva ao fato de que estes, além da habilidade em secretar uma grande variedade de metabólitos secundários e ácidos orgânicos em meio de cultura, não produzem toxinas consideradas nocivas ao homem (GYSLER et al., 1990).

2.3.3. Secreção de enzimas microbianas

Convencionalmente, enzimas extracelulares são definidas como aquelas que atravessam a membrana da célula. Este ponto é importante porque os microrganismos possuem uma variedade de estruturas de parede celular e, em muitos casos, a enzima extracelular está a elas associada.

Durante a síntese dentro de uma célula bacteriana, certas proteínas são reconhecidas como sendo destinadas para exportação pela presença de um peptídeo sinal N-terminal. Estas enzimas extracelulares são parcialmente sintetizadas nos ribossomos livres no citosol antes da junção do complexo (dirigido pelo peptídeo sinal N-terminal) com a membrana celular (DEVIS & TAI, 1980 *apud* GACESA & HUBBLE [198-]). A biossíntese da enzima continua então com secreção concomitante ao aumento da cadeia polipeptídica (Secreção co-traducional). Durante o processo de secreção, o peptídeo N-terminal é removido por uma peptidase ligada à membrana, como pode ser visto na Figura 2.

Em fungos e outros eucariotos, o processo de secreção é semelhante aquele descrito para células bacterianas. Contudo, durante a síntese, a cadeia peptídica é empurrada através do "lúmen" do retículo endoplasmático antes que diretamente para dentro da membrana citoplasmática (WALTER *et al.*, 1984, *apud* GACESA & HUBBLE, [198-]). A partir do "lúmen" do retículo endoplasmático a enzima é processada através do aparelho de Golgi e é finalmente exportada na forma de vesículas para a membrana celular.

A complexidade encontrada das células eucarióticas permite explicar como as enzimas secretadas são modificadas extensivamente durante sua passagem através do retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, conforme Figura 3.

(a) *Formação inicial do complexo ribossomo / RNAm*

(b) *Início da biossíntese proteica*

(c) *Peptídeo sinal dirigindo a interação do ribossoma à membrana plasmática*

(d) *Remoção do peptídeo sinal*

(e) *Fim da biossíntese proteica*

- Embora o sinal de reconhecimento e receptor ribossomal da proteína tenha sido identificado em eucariotos sua presença em procariotos tem somente sido inferida para estudos genéticos.

Figura 2: Secreção Co-traducional de proteína bacteriana.

Fonte: GACESA & HUBBLE [198-].

Figura 3: A secreção e processamento de enzimas em eucariotos. Do lado direito do diagrama vê-se o itinerário e concomitante processamento de proteínas secretórias pelos ribossomos ligados a membrana seguidos de exocitose. Do lado esquerdo observa-se como uma proteína integral da membrana feita no retículo endoplasmático usa a mesma via para atingir o seu destino.

Fonte: DUVE (1985).

Estas modificações pós-traducionais, as quais podem incluir glicosilação, remoção de pequenos fragmentos de peptídio, introdução de pontes disulfídicas dentre outros, usualmente têm importante influência na estabilidade e propriedade das enzimas (FREEDMAN & THWINKS, 1990). Cabe mencionar que, embora este seja um mecanismo geral de operação em eucariotos, existem fungos que não possuem um aparelho de Golgi convencional. Nestes casos o mecanismo de secreção ainda não é conhecido (GACESA & HUBBLE, [198-]).

Ainda, segundo estes autores, bactérias e fungos são circundados por parede celular que são compostas por complexos de peptídeo-glicana e ligações (1 → 3) glucana/quitina, respectivamente. No caso de bactérias Gram positivas e fungos, as enzimas são usualmente secretadas por difusão através da parede celular para o meio externo. Por outro lado, algumas enzimas permanecem associadas à célula, ligadas à membrana ou à parede celular.

Em bactérias Gram negativas a secreção de enzimas é mais complexa devido à presença da membrana exterior. Conseqüentemente, enzimas secretadas ficam freqüentemente retidas no espaço periplasmático (espaço entre a parede celular e a membrana interna) antes de serem liberadas ao meio de cultura. Esta membrana extra e a localização de diferentes proteínas têm restringido o uso de microrganismos Gram negativos para a produção de enzimas extracelulares.

Para efeito comparativo a Figura 4 mostra as principais diferenças na estrutura da parede celular entre bactérias e fungos.

Figura 4 - Representação diagramática de estruturas típicas de parede celular: a) uma bactéria Gram positiva; b) uma bactéria Gram negativa; c) um fungo. Fonte: GACESA & HUBBLE ([198]).

2.3.4. Metabolismo microbiano de poligalacturonatos - (pectina)

A degradação de substâncias pécticas por enzimas microbianas extracelulares resulta no acúmulo de uma variedade de produtos.

O metanol é formado pela atividade da pectinesterase. O metanol serve como fonte de carbono e energia para uma série de microrganismos que usam este composto, seja obrigatoriamente ou facultativamente. Pectina é a maior fonte de metanol, porém não se conhece nenhum microrganismo que se utilize do metanol para produção de pectinesterase (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

O ácido D-galacturônico e oligogalacturonatos são os produtos finais da atividade de endopoligalacturonase. Pectatolases produzem uma série de oligômeros insaturados chamados oligogalacturonatos, dos quais o resíduo terminal é um 4,5-dehidrogalocturonato. Pectina-liases produzem metil-ésteres de oligômeros insaturados.

Poucas pesquisas têm sido realizadas sobre o metabolismo de pectina em fungos e, assim sendo, pouco é conhecido a este respeito. Entretanto, este metabolismo realizado por bactérias tem sido muito estudado nas duas últimas décadas (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

Aparentemente, a degradação bacteriana de poligalacturonatos leva à produção de dois monômeros diferentes, a saber: ácido D-galacturônico e ácido 4-deoxi-L-5-treo-hexoseulose urônico, que são metabolizados por três diferentes vias metabólicas, as quais podem ser observadas na Figura 5.

Figura 5: Via metabólica do ácido poligalacturônico em bactéria.
 Fonte: ROMBOUTS & PILNIK (1980).

O ácido 4-deoxi-L-5-treo-hexoseulose urônico é inicialmente isomerizado em ácido 3-deoxi-D-glicero-2,5-hexodiulsônico, o qual é reduzido por uma oxode-oxigluconato desidrogenase em ácido 2-oxo-3-deoxigluconato. Este composto é fosforilado pela oxode-oxigluconato quinase e então metabolizado pela via Entner-Doudoroff.

O ácido D-galacturônico é metabolizado por duas diferentes vias, como demonstrado na Figura 5. Na primeira, o ácido D-galacturônico é isomerizado pela uronato isomerase (EC. 5.3.1.12) em ácido D-tagaturônico. A seguir ocorre a redução pela D-altronato desidrogenase (EC. 1.1.1.58) a ácido D-altrônico, o qual é desidratado através da D-manoato hidrolase (EC. 4.2.1.8), formando o ácido 2-oxo-3-deoxi-glucônico. Este composto é fosforilado pela via de Entner-Doudoroff. A via alternativa do ácido D-galacturônico é sua oxidação a D-galactárico, o qual, depois de várias conversões entra no ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

É difícil estimar a importância relativa dessas três vias para bactérias. Entretanto, tem-se demonstrado que a via do ácido 4-deoxi-L-treo-5-hexoseulose urônico é mais importante do que a do ácido D-tagaturônico, ao passo que a via do ácido galactárico está restrita a espécies de *Pseudomonas* e *Agrobacterium* (ROMBOUTS & PILNIK, 1980 *apud* MAIORANO, 1990).

2.3.5. Controle da produção de enzimas microbianas - fatores que influenciam na produção

Aspectos importantes referentes a produção de enzimas microbianas têm sido descritos por um grande número de patentes e literatura científica. Os procedimentos adotados na produção variam de acordo com os interesses da empresa produtora (WALLERSTEIN, 1911, BECKHORN, 1960, BECKHORN *et al.*, 1965). Contudo, de maneira geral, os métodos de produção de enzimas por fermentação mais utilizados podem ser classificados como: método de cultura submersa e método de cultura semi-sólida (PARK, 1986).

Existem controvérsias, no que diz respeito ao melhor método a ser empregado. Entretanto, nas últimas décadas com os avanços na área de Engenharia bioquímica, tem-se observado na literatura pertinente, um crescente interesse pelos processos fermentativos em semi-sólida. Nestas, são

descatadas as numerosas vantagens que este tipo de cultivo oferece sobre a fermentação submersa (NARAHARA *et. al.* 1982; GHILDYAL *et. al.* 1992).

Segundo DEMAÏN (1972) e GACESA & HUBBLE ([198-]), a otimização da produção de enzimas por microrganismos é dependente de uma série de fatores interrelacionados, tais como: linhagem microbiana utilizada, temperatura, pH, transferência de oxigênio, composição do meio, velocidade de crescimento, indução/repressão pelo produto final, repressão catabólica e manipulação genética, sendo alguns destes fatores a seguir abordados.

O substrato e a concentração deste no meio de cultivo é um dos fatores que influencia a produção de enzimas pectinolíticas. FOGART & KELLY (1983) relatam que a utilização de partes balanceadas de C/N e sais minerais, em fermentações submersas, são desejáveis para a produção de enzimas constitutivas. Ainda, segundo estes autores, a maior parte das pectinases comerciais são enzimas indutivas; assim substratos contendo pectina devem ser adicionados no meio para estimular a produção dessa enzima. Estes substratos incluem casca de frutas cítricas, maçã entre outros resíduos industriais. Dessa forma, à medida que estes substratos ou produtos degradados derivados destes, tornem-se disponíveis para o organismo, poderiam então induzir um aumento enorme na síntese da enzima.

LARIOS *et al.* (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. Entretanto, a produção de exopoligalacturonase 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. Verificou-se também que a maior produção enzimática foi obtida quando o meio de cultivo foi suplementado com 3% do referido resíduo.

Já PETRUCCIOLI *et al.* (1989) observaram que um aumento na concentração do substrato (resíduo da casca de laranja) de 3,0 para 4,5% resultava em diminuição no rendimento da enzima produzida por *Aureobasidium pullulans*, provavelmente devido à repressão da síntese pela presença de açúcares simples prontamente utilizáveis, ou simplesmente porque não se trata do mesmo organismo.

Um outro fator importante a ser considerado na produção de enzimas pectinolíticas está relacionado à linhagem microbiana a ser utilizada. De maneira geral, a enzima é sintetizada durante parte do ciclo de crescimento, ou seja, algumas proteínas são sintetizadas e secretadas durante a fase exponencial de crescimento podendo, em alguns casos, serem produzidas na fase estacionária (GACESA & HUBBLE, ([198-])), como pode ser observado no exemplo ilustrado na Figura 6.

Figura 6: Síntese enzimática como uma função do crescimento microbiano. Três exemplos típicos da produção de enzima por microrganismos estão ilustrados, embora deva ser enfatizado que alguma situação intermediária é possível.

Fonte: GACESA & HUBBLE ([198-]).

Em vista das variações no comportamento quanto a síntese enzimática, fica evidente a necessidade de maior investigação no que se refere ao controle genético da produção dessas substâncias. Estudos que viessem elucidar a síntese enzimática em fungos filamentosos, poderiam ser extremamente valiosos, já que devido a grande variabilidade encontrada entre espécies associada às alterações nas condições de fermentação poderiam contribuir bastante com modificações desejáveis no perfil de produção inicial (BOOTH & HIGGINS, 1986).

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

AGUILAR & HUITRON (1987), estudando os mecanismos regulatórios, outro importante fator influenciável na produção, verificaram que com a adição do 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 atividade pectinolítica, avaliada pela liberação de grupos redutores, não foi afetada quando baixas concentrações de glicose ou ácido galacturônico 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 da glicose na 24ª hora de cultivo, mas foi estimulada pela adição de ácido galacturônico no mesmo tempo, sugerindo sua participação na indução dessa atividade. Entretanto, repressão catabólica foi observada quando esses substratos foram adicionados no início do cultivo. Ambas atividades pectinolíticas foram fortemente reprimidas quando glicose foi adicionada em altas concentrações e, menos afetada quando ácido galacturônico foi adicionado também em altas concentrações.

A produção de poligalacturonase por um mutante de *A. niger*, adenina requerente, foi induzida e sujeita à repressão catabólica. Glicose, frutose ou intermediários de glicólise, mas não intermediários do ciclo do ácidos tricarboxílicos, reprimiram a síntese da enzima, sendo que a repressão

catabólica por glicose ocorreu rapidamente e quase por completo (ROMBOUTS & PILNIK, 1980).

MALDONADO *et al.* (1989) estudaram a repressão catabólica da síntese de poligalacturonase e pectinesterase induzidas por *A. niger* sp., isolada de limão, em estado de degradação, e verificaram que tais enzimas eram reprimidas pela glicose, até mesmo na presença do indutor. A produção de ambas as enzimas iniciaram novamente quando o açúcar foi consumido, ou quando o micélio foi lavado e incubado em novo meio contendo indutor e livre de glicose, demonstrando a reversibilidade do mecanismo de repressão. O efeito da glicose foi também testado na ausência da transcrição através da utilização de um repressor actinomicina (Am), ocorrendo aumento da produção de pectinesterase nas primeiras 4 horas e cessando a seguir. Quando usaram cicloheximida (CH), um repressor de tradução, a produção de pectinesterase decaiu marcadamente. Os resultados obtidos sugeriram que a repressão ocorre a nível traducional.

Vale também mencionar outros fatores, como pH e temperatura, os quais também são importantes parâmetros de avaliação durante a produção enzimática. MANACHINI *et al.* (1988) verificaram que *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-Sephadex 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. Outros autores demonstraram que a maior produção de poligalacturonase ocorre em pH ácido, geralmente em torno de 3,0 a 4,0 (LARIOS *et al.*, 1989, PETRUCCIOLI *et al.*, 1989, BAILEY & PESSA, 1990).

A temperatura ótima de crescimento e produção de pectinase parece depender do microrganismo utilizado. LARIOS *et al.* (1989), trabalhando com *Aspergillus* sp, verificaram que ocorreu maior crescimento e produção de atividade pectinolítica quando as culturas foram incubadas a 37°C. PETRUCCIOLI *et al.* (1989) obtiveram maior produção dessas enzimas por *Aureobasidium pullulans* quando a temperatura de cultivo foi 24°C; e todas as linhagens de *Cylindrocarpus destructans*, patogênicas ou não, tiveram a

de exo e endopolimetilgalacturonase diferentemente afetadas por várias temperaturas e valores de pH (STRZELCZYK *et al.*, 1987).

2.4. Importância e aplicação de enzimas pectinolíticas

O uso de enzimas remonta milhares de anos, as quais basicamente tem sido utilizadas nas Indústrias de Alimentos, Bebidas, Têxtil, Papeleira e Farmacêutica. Isto se deve principalmente às vantagens que estes biocatalisadores apresentam, como por exemplo: alta especificidade, maior atividade, etc. (MAIORANO, 1990).

Atualmente, enzimas microbianas são usadas para melhorar o processo industrial, ou seja, para capacitar a utilização de novos tipos de matéria-prima ou para melhorar as propriedades físicas do material. Também são usadas para melhorar produtos, alterando cor, aroma, textura, sabor, ou tempo de prateleiras de gêneros alimentícios, assim como para torná-los mais aceitáveis junto ao consumidor (WISEMAN, 1985).

As enzimas pectinolíticas constituem-se num importante grupo dentre as enzimas microbianas. A maioria das enzimas pécticas são formadas por uma mistura complexa de tipos distintos de enzimas. Essa mistura geralmente contém pectinesterase e poligalacturonase, e provavelmente outras mais, sendo produzidas por várias espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (LINEWEAVER & JANSEN, 1951; PARK & PAPINI, 1968).

A utilização das enzimas pectinolíticas tem ocorrido principalmente nas indústrias de alimentos, sendo na clarificação de sucos de frutas sua maior aplicação (ROMBOUTS & PILNIK, 1980). A adição de enzimas pécticas à uva ou outras frutas, antes da moagem ou esmagamento, resulta em aumento do suco no momento da prensagem. O caldo resultante das frutas assim tratadas tornam-se geralmente mais claro, límpido e apresenta melhor coloração (LINEWEAVER & JANSEN, 1951).

A turvação dos sucos de frutas dificilmente é removida por filtração, dado a grande quantidade de material em suspensão que estes sucos contêm. Isso acontece devido à ação coloidal da pectina da fruta original. Ao contrário, o suco de frutas previamente tratado com enzimas pécticas é mais facilmente clarificado por filtração, sendo que a ação dessas enzimas não

altera a cor e nem o gosto do suco final (PARK & PAPINI, 1968).

O suco de pêra também tem sido tratado com pectinase, resultando numa queda rápida da viscosidade e na diminuição da turbidez, formando flocos que sedimentam. Após a filtração ou centrifugação, obtém-se um suco claro. 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).

As enzimas pécticas são bastante usadas na produção de sucos de alta densidade. Na elaboração do suco de maçã concentrado é necessária e indispensável a adição dessas enzimas para remoção de toda a pectina existente, caso contrário, haveria formação de gel e, conseqüente depreciação do produto. No processamento para obtenção de sucos de frutas, normalmente estes são despectinizados e filtrados antes da concentração (PARK & PAPINI, 1968).

As preparações comerciais de enzimas pécticas usadas na indústria de alimentos, geralmente originam-se de fungos, especialmente do *Aspergillus niger*. Tais fontes normalmente contêm 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).

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, cacau e fibras de plantas, visando a remoção da polpa indesejada da fruta (CALL *et al.*, 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, a qual possui baixo grau de esterificação. Entretanto, a maceração pode também ser feita com uma pectina liase pura. Se celulase é usada em associação às enzimas pécticas, uma liquefação quase completa dos frutos e vegetais pode ser conseguida

(ROMBOUTS & PILNIK, 1980). Uma aplicação biotecnológica importante das enzimas macerantes é o isolamento de protoplastos de células vegetais (SREENATH *et al.*, 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).

2.5. Isolamento e seleção de fungos produtores de enzimas pectinolíticas

A seleção apropriada de microrganismos constitui a primeira e mais importante fase na produção de qualquer enzima comercial (PARK, 1968). O isolamento envolve a obtenção de culturas puras, seguido de avaliação quanto à atividade ou produção da enzima de interesse. Em alguns casos, métodos direcionados de isolamento, como por exemplo a técnica de enriquecimento, tem sido usados. Em outros casos, dá-se preferência pelo isolamento aleatório. De qualquer modo devem ser estabelecidos parâmetros entre a produtividade do microrganismo e o contexto econômico do processo (STANBURY & WHITAKER, 1984).

BULL *et al.* (1979) citaram alguns pontos importantes a serem considerados como critérios na escolha do organismo, quais sejam:

- 1) Características nutricionais interessantes, ou seja, capacidade de utilizar meios baratos, com fontes de energia mais acessível;
- 2) Temperatura ótima, de crescimento e/ou produção;
- 3) Adequação das condições do processo ao microrganismo;
- 4) Estabilidade do microrganismo e a sua tratabilidade para manipulações genéticas;
- 5) A produtividade do organismo, medida na sua capacidade de converter o substrato em produto, além de apresentar um alto rendimento do produto por unidade de tempo;
- 6) Fácil recuperação do produto.

Segundo BULL *et al* (1979), os quatro últimos critérios podem ser avaliados em testes detalhados, subsequentemente ao isolamento. O microrganismo selecionado com base nestes resultados deverá gerar um processo economicamente viável. Contudo, antes do processo ser colocado em operação, a toxicidade do produto e do microrganismo também devem ser avaliadas.

Ambientes naturais são a principal fonte na obtenção de tais microrganismos. Os microrganismos também podem ser selecionados entre linhagens obtidas de coleções de cultura. MARTIN & SKERMAN (1972) citaram várias coleções de cultura bastante conhecidas, como a: NCTC - National Collection of Type Cultures (Inglaterra); ATCC - American Type Culture Collection (USA); Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (França), entre outras. Entretanto, apesar de tais coleções possuírem em seu acervo microrganismos com características conhecidas, nem sempre estes possuem a maioria dos aspectos desejados, ao passo que o ambiente natural, com sua microbiota rica, pode permitir o isolamento de microrganismos com características satisfatórias.

Provavelmente, a aquisição de culturas em coleções teria um custo reduzido se comparado ao isolamento de fontes naturais; por outro lado, é possível que um microrganismo superior possa ser encontrado após exaustiva busca em ambientes naturais (STANBURY & WHITAKER, 1984). Talvez seja por esta razão que os procedimentos de isolamento normalmente são a partir de fontes ambientais (frequentemente solo), a exemplo de PARK *et al.* (1972), que descreveram o isolamento de mais de 200 espécies entre fungos, bactérias e leveduras, onde o critério seletivo foi a capacidade de produção de enzimas pectinolíticas extracelulares, por meio de clarificação do suco de várias frutas.

O meio sólido tem sido bastante utilizado para o isolamento e seleção de linhagens produtoras de enzimas. Esta técnica usualmente envolve o emprego de um meio seletivo, contendo o substrato específico da enzima, o qual favorece o isolamento de linhagens possivelmente capazes de sintetizar o metabólito de interesse (STANBURY & WHITAKER, 1984). Variações no método de seleção em placas (meio sólido) tem sido descrito (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975; MCKAY, 1988; TSUYUM *et al.*, 1989), tanto para

detecção de enzimas pectinolíticas produzidas por fungos, quanto para diferenciação entre as enzimas encontradas neste complexo.

A seleção em meio sólido pode ser feita por avaliação semiquantitativa através do Índice de relação enzimática, obtido pela divisão entre a medida do diâmetro do halo de degradação que apresenta uma zona clara no ágar, após precipitação do substrato intacto, e a medida do diâmetro da colônia. Desta maneira, a atividade de variantes de algumas espécies pode ser examinada. Contudo a relação pode não ser válida, ressalta HANKIM & ANAGNOSTAKIS, (1975), quando espécies diferentes são comparadas entre si.

Apesar deste método ser rotineiramente usado para "screening" rápido, é necessária devida cautela, já que nem sempre existe correlação entre os dados encontrados em placas (meio sólido) e aqueles obtidos em fermentações submersas. AUNSTRUP *et al.* (1972), testando diferentes espécies de *Bacillus* quanto à produção de protease alcalina, não encontraram correlação entre os métodos semiquantitativo (meio sólido) e o quantitativo (meio líquido).

2.6. Preservação de linhagens fúngicas produtoras de enzimas pectinolíticas

O isolamento de microrganismos para uso em processos industriais pode ser um procedimento longo, árduo e, às vezes, muito caro. Linhagens industrialmente empregadas, quer sejam novos isolados ou linhagens padrões, melhoradas ou não, constituem a base para a boa realização dos processos pelos quais tais culturas são responsáveis. Assim sendo, é essencial que sejam mantidas suas características de interesse. A seleção de métodos adequados à manutenção não constitui assunto recente (GREENE & FRED, 1934), sendo considerada por alguns autores tão importante quanto o próprio melhoramento genético.

A utilização de um único método de manutenção até se adquirir ampla experiência com determinados microrganismos é freqüentemente desaconselhada, já que a produção de substâncias industrialmente importantes pode depender de fatores ligados ao método de preservação empregado

(CALAM, 1964, KIRSOP, 1986). Entre tais fatores, destacam-se não apenas a manutenção de altos níveis de viabilidade celular, como características morfofisiológicas e taxonômicas, além da prevenção de contaminações indesejáveis.

A literatura especializada é rica na descrição de procedimentos aplicáveis a diferentes gêneros e espécies (KIRSOP, 1984, SMITH & ONIONS, 1983, GROUT *et al.*, 1993). Um só método dificilmente é considerado amplamente aplicável a qualquer espécie e a escolha do método é dependente não só da experiência, dos materiais e equipamentos disponíveis, bem como das características particulares e demanda da cultura em questão. Em geral, no entanto, a literatura serve como guia, mas o assunto muitas vezes ainda depende da experiência empírica (HILL, 1981).

Naturalmente, cada método apresenta vantagens e desvantagens as quais devem ser consideradas, ao lado dos fatores acima mencionados, na ocasião da escolha. Culturas fúngicas podem ser mantidas tanto em forma de micélio, como de esporos.

Subcultivos periódicos são amplamente utilizados na preservação de pequenas coleções de fungos, tendo como principais desvantagens a constante possibilidade de contaminação a cada repique, erro de rotulação ou de protocolos, seleção de clones mais resistentes ao stress do estoque prolongado, além de ser trabalhoso e dispendioso em termos de custo de meio de cultura e espaço para o armazenamento. Micotecas sofrem freqüentemente o risco adicional de se contaminarem por ácaros micófagos que, além de destruírem as culturas, carregam contaminações à medida que infestam diferentes tubos (SMITH & ONIONS, 1983, HILL *et al.*, 1991). Variação de linhagens, alterações de patogenicidade ou outras características fisiológicas e morfológicas têm sido reportadas após o emprego deste método.

A aplicação de uma camada de óleo mineral cobrindo culturas em agar inclinado é outro modo de preservação empregado, prevenindo a desidratação e diminuindo a atividade metabólica através da redução da tensão de oxigênio. Este procedimento foi descrito em décadas passadas (BUELL & WESTON, 1947), sendo empregado em alguns laboratórios com sucesso. Entretanto, não está livre da contaminação de esporos aéreos; algumas culturas apresentam crescimento lento quando da recuperação,

passagens sucessivas podem ser altamente seletivas, além da recuperação ser dificultada. O método requer atenção especial culturas patogênicas, pois na presença do óleo, quando se flamba a alça durante a recuperação ocorre um espalhamento do material nela contido, podendo causar contaminações (SMITH & ONIONS, 1983).

A manutenção de esporos dispersos em solo estéril, distribuídos em frascos rosqueados e armazenados em refrigerador tem se mostrado um método eficiente na manutenção por longos períodos, com razoável estabilidade. A umidade inicial deste ambiente permite um breve crescimento antes da cultura entrar em fase de latência, entretanto, em alguns casos verificou-se a emergência e predominância de mutantes durante esta fase de crescimento (BOOTH, 1971). O baixo custo e a facilidade de recuperação das células são vantagens adicionais deste método, embora haja necessidade de espaço para armazenamento sob refrigeração.

A suspensão de esporos em água destilada é um outro método descrito por CASTELLANI (1967) e usado com sucesso mesmo para algumas células na sua forma vegetativa (SILVA *et al.*, 1992). Blocos de agar contendo culturas fúngicas também têm sido estocados suspensos em água. A literatura não apresenta explicações razoáveis para o sucesso deste método, especialmente para células vegetativas. As vantagens apresentadas são semelhantes às do emprego de solo e, como desvantagens, além das citadas para o uso de solo, reside a emergência de colônias "petites" no caso de leveduras (SILVA, 1990).

Os métodos comentados são de baixo custo, sendo apropriados para coleções com pequeno número de cultura por não requererem equipamentos sofisticados e serem de fácil execução.

A secagem é uma outra forma largamente empregada na preservação microbiana, e no que se refere aos fungos, muitos são os esporos capazes de sobreviver a condições de secagem, recuperando-se quando as condições de umidade são restabelecidas. Parece razoável imaginar que tais fungos apresentam esta capacidade graças à parede espessa de seus esporos.

Este método de secagem pode ser feito utilizando-se vários suportes como solo, sílica-gel, celulose, pérolas de vidro, discos de gelatina,

etc. (PERKINS, 1962, THOMPSON, 1987, MALIK, 1988). Esta é a forma mais simples de se suprimir o metabolismo, embora a maioria das culturas não sobrevivam à secagem pura e simples em laboratório, algumas sobrevivem por muitos anos, como é o caso dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Este método de preservação é bastante suscetível a infestação por ácaros, possibilitando também a introdução de outros contaminantes cada vez que uma amostra é manipulada. Apesar do baixo custo da prevenção a infestação por ácaros, sua aplicação tem sido limitada a fungos capazes de esporular (SMITH, 1984).

A liofilização consiste numa forma de secagem de esporos fúngicos a vácuo após o congelamento suspensos em substâncias protetoras, cuja função é a prevenção de danos advindos do congelamento em si e da própria secagem (PITOMBO, 1989). É um método apropriado para manutenção de altos níveis de viabilidade por longos períodos, não requerendo tanto espaço, pois pequenos volumes são liofilizados e armazenados em ampolas em refrigerador doméstico. Além disso, a facilidade de distribuição de ampolas para outros laboratórios, e a facilidade de se preparar várias ampolas de uma só vez, são vantagens adicionais quando se tem grande número de culturas a manipular (KIRSOP, 1983).

Entretanto, requer equipamento apropriado e apenas aquelas linhagens capazes de apresentar esporulação abundante podem ser submetidas a este método, já que células miceliais não resistem ao stress causado pela liofilização. Neste aspecto, o crescente emprego, nas últimas décadas, de conservação a temperaturas ultra baixas, próximas à do nitrogênio líquido, têm se mostrado mais eficiente para algumas espécies, o que enfatiza a necessidade de seleção do método adequado a espécies de interesse (SILVA, 1990).

O emprego da criopreservação reduz a atividade metabólica, de modo que alterações fenotípicas ou genotípicas sejam diminuídas, desde que certos cuidados sejam tomados durante o congelamento e descongelamento, como o abaixamento lento da temperatura em uma fase inicial (1°C/min) e recuperação por um aquecimento rápido a 37°C.

O método acima pode ser aplicado à culturas fúngicas capazes ou não de esporular e a resposta negativa de algumas espécies tem sido atribuída a pequenos erros técnicos que podem ser ajustados, já que mesmo

células animais têm sido mantidas com sucesso por este método.

O uso de protetores apropriados, bem como a condição de cultivo são fatores de grande relevância à semelhança da liofilização (KIRSOP, 1984, SILVA, 1992). A principal desvantagem neste caso reside no custo do equipamento e a necessidade de constante fornecimento de nitrogênio líquido que se não houver, resulta na perda das culturas.

Pelo exposto, conclui-se que a necessidade do emprego de mais de uma forma de conservação é o procedimento mais seguro em situações nas quais não se conhecem as características das linhagens estudadas, como é o caso de novos isolados, mutantes e melhorados, bem como na preservação de culturas interessantes sob o ponto de vista industrial.

As principais coleções de culturas no mundo empregam a liofilização e a criopreservação em nitrogênio líquido, pois manipulam grande número de linhagens e tais métodos apresentam as vantagens já descritas, além de manterem altos níveis de viabilidade. Os demais procedimentos descritos não estão, todavia, descartados, pois devem ser levados em consideração na escolha do método, os recursos disponíveis em cada laboratório, o número e necessidade de distribuição, bem como o valor de cada cultura (SILVA, 1990, SILVA, 1992).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismos utilizados

3.1.1. Isolados selvagens

As linhagens fúngicas isoladas no presente trabalho foram obtidas a partir de amostras de solo coletadas no Sítio Paredão Vermelho - Arthemis/SP, Fazenda Monte Belo - Colina/SP (ambas regiões de plantio de frutas cítricas), e de solo de Jardim Doméstico. Também foram realizados isolamentos a partir de frutas em estado de degradação como laranja, maracujá e uva, objetivando a obtenção de fungos capazes de degradar a pectina, ou seja, fungos pectinolíticos.

3.1.2. Linhagens advindas de coleções de cultura

Também foram testadas as linhagens fúngicas existentes no Laboratório de Microbiologia Industrial / AB / DQ, do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, S/A - IPT.

1 - <i>A. niger</i> NRRL-377	(FP/102)
2 - <i>A. niger</i> NRRL-3122	(FP/103)
3 - <i>A. niger</i> ATCC-1025 (IZ-150)	(FP/104)
4 - <i>A. awamori</i> AWG-547	(FP/105)
5 - <i>A. awamori</i> NRRL-3112	(FP/106)
6 - <i>A. oryzae</i>	(FP/107)
7 - <i>A. tamarii</i>	(FP/108)

As linhagens 1 à 5 foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da EPUSP (Escola Politécnica da USP).

A linhagem 6 cedida pela FEI (Faculdade de Engenharia Industrial), e a linhagem 7 cedida pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias - RJ).

3.2. Manutenção das linhagens e obtenção de esporos

Todas as linhagens aqui utilizadas foram mantidas em cultura pura através de repiques sucessivos em meio sólido inclinado (ATCC - 325, ATCC - MEDIA HANDBOOK, 1984).

Os repiques foram realizados através de transferências assépticas (com alça de platina) de uma pequena porção do micélio, para tubos de ensaios contendo o meio sólido indicado acima.

A nova cultura foi incubada, durante 5 a 7 dias, em estufa bacteriológica a 30°C e os esporos formados foram utilizados para inocular meios de cultura líquidos ou sólidos para os estudos previstos, ou então, estes tubos foram mantidos sob refrigeração (4°C), para estoque.

Para o primeiro propósito, coletavam-se os esporos assepticamente em solução de Tween 80 (0,01% V/V) estéril, agitando-se levemente. A seguir determinava-se a concentração de esporos desejada por contagem em câmara de Neubauer sob microscópio óptico.

3.3. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e soluções aqui utilizados foram esterilizados em autoclave, por 30 minutos, a 121°C e 1 atm. A incubação sempre foi realizada a uma temperatura de 30°C.

3.4. Meios de cultura e soluções utilizados

3.4.1. Meio Malt Extract Agar (Blakeslee's Form) - ATCC - 325 (ATCC MEDIA HANDBOOK), 1984

Extrato de malte	20.0g
Glicose	20.0g
Peptona	1.0g
Ágar	20.0g
Água destilada	1000ml

3.4.2. Meio de Hankin (MH) (Hankin & Anagnostakis, 1975)

Solução A

Extrato de levedura	1.0g
Pectina cítrica	5.0g
Ágar	15.0g
Água destilada	500ml

Solução B (sais minerais)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0g
KH_2PO_4	4.0g
Na_2HPO_4	6.0g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2g
CaCl_2	10.0g
H_3BO_3	10.0 μg
MnSO_4	10.0 μg
ZnSO_4	70.0 μg
CuSO_4	50.0 μg
MoO_3	10.0 μg
Água destilada	500.0ml

O meio acima citado, quando utilizado, sofreu variações:

Modificação 1 - MH - Sólido

Neste caso, a solução A foi preparada como indicado e seu pH ajustado para 7.0 com NaOH 4N.

A solução B teve ajuste de seu pH para 3.5 - 4.0 com ácido sulfúrico antes da autoclavação. Após a esterilização, a mistura das soluções A e B sofreu novo ajuste de pH para 3.5 - 4.0 com ácido tartárico esterilizado 30% (P/V).

Modificação 2 - MH - Líquido

Nesta, o preparo das soluções A e B sofreu alterações. A solução A foi preparada sem adição do agar e da solução B, suprimiu-se Na_2HPO_4 ; ambas as soluções foram dissolvidas em tampão citrato-fosfato, para que o pH desejado 3.6. fosse alcançado.

3.4.3. Meio mínimo (PONTECORVO *et al.*, 1953)

NaNO_3	5.0g
KH_2PO_4	1.5g
KCl	0.5g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5g
FeSO_4	0.01g
ZnSO_4	0.01g
Glicose	10.0g
Agar	15.0g
Água destilada	1000ml

O pH foi ajustado para 6.8 com NaOH 1N.

3.4.4. Meio completo (Pontecorvo *et al.*, 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973).

Foram adicionados ao meio mínimo:

Peptona	2.0g
Caseína hidrolizada	1.5g
Extrato de levedura	2.0g
Soluções de vitaminas	1.0g

O pH foi ajustado para 6.8. com NaOH1N.

3.4.5. Soluções de vitaminas

Ácido nicotínico	100.0mg
Ácido paraminobenzóico	10.0mg
Biotina	0.2mg
Piridoxina	50.0mg
Riboflavina	100.0mg
Tiamina	50.0mg

A solução foi esterilizada em banho-maria a 90°C, por 20 minutos e conservada sob clorofórmio, em frasco escuro, no refrigerador.

3.4.6. Solução tampão de McIlvaine, (MCLLVINE, 1921)

Solução A

Ácido cítrico 0,1M	19.21g
Água destilada	1000 ml

Solução B

Fosfato dibásico de sódio (7 H ₂ O)	53.65g
Água destilada	1000ml

Tomaram-se 33.9ml da Solução A e 16.1ml da Solução B para um total de 100ml, ajustado com água destilada, obtendo-se assim um pH em torno de 3.6.

3.4.7. Solução tampão acetato (MAIORANO, 1990)

Solução A

Ácido acético	3.0g
Água destilada	100.0ml

Solução B

Acetato de sódio	10.0g
Água destilada	100.0ml

Solução C

Benzonato de sódio	10.0g
Água destilada	100.0ml

Para obtenção da solução tampão acetato pH = 4, tomaram-se 73.6ml da Solução A mais 26.4ml da Solução B e 2.5ml da Solução C, completando-se o volume para 1000ml com água destilada.

3.4.8. Solução salina

NaCl	0.85g
Água destilada	100.0ml

3.4.9. Solução "Tween 80" (0.01% v/v)

Tween 80	0.01ml
Água destilada	100.0ml

3.4.10. Solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio (1%)

Brometo de hexadeciltrimetilamônio	1.0g
Água destilada	100.0ml

3.4.11. Solução de pectina

Pectina cítrica (ESKISA)	0.63g
Tampão acetato pH=4.0	100.0ml

Suspendeu-se a pectina em metade do volume do tampão (item 3.4.7.) deixando-se a mistura sob agitação em agitador magnético por uma noite e, a seguir, completou-se o volume restante do tampão para atingir um total de 100ml.

Esta solução foi preparada na concentração inicial de 0,63% de pectina para, quando misturada às amostras para medida de atividade, atingir a concentração final de 0.5% (MAIORANO, 1990).

3.4.12. Solução albumina 50%

Uma clara de ovo foi colocada num becker e picotada vagarosamente com auxílio de uma tesoura durante uma hora. Filtrou-se e ao filtrado adicionou-se glicerina (v/v) e cristais de cânfora. A solução foi mantida em refrigerador a 4°C.

3.4.13. Solução tampão fosfato pH 6.9 (0.2M)

Solução A

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	27.6 g
Água destilada	1000 ml

Solução B

Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	28.4g
Água destilada	1000ml

As soluções A e B foram conservadas no refrigerador, sendo o tampão fosfato preparado no momento do uso, misturando-se 45ml da solução A e 55ml da solução B.

3.4.14. Solução de giemsa

Giemsa	1.0g
Glicerina	66.0ml
Metanol	66,0ml

A Solução foi preparada pela adição de Giemsa em glicerina a 60°C e, após resfriamento, à temperatura ambiente, foi adicionado metanol.

Filtrou-se e conservou-se esta solução à temperatura ambiente.

3.4.15. Solução de desoxicolato de sódio (10% p/v)

Desoxicolato de sódio	10,0 g
Água destilada	100,0 ml

Esta solução foi sempre autoclavada e mantida em refrigerador.

3.5. Isolamento dos fungos pectinolíticos

3.5.1. Isolados do solo

Foram realizadas três coletas de solo no Estado de São Paulo, sendo uma na capital, de jardim doméstico, a segunda na região de Arthemis, próximo a Piracicaba, e a terceira coleta realizada em Colina. Em Piracicaba e Colina, as amostras de solo foram retiradas de propriedades particulares, em áreas destinadas ao plantio de laranjas. Estas amostras receberam a denominação de SP (solo de Piracicaba), SC (solo de Colina) e SJD (solo de jardim doméstico).

As amostras de solo foram coletadas da superfície numa profundidade máxima de 20 cm, acondicionadas em sacos plásticos para transporte. O isolamento dos fungos baseou-se em PARK *et al.*, (1972), conforme o procedimento abaixo:

1. Tomaram-se 10g de cada amostra coletada, as quais foram colocadas em Erlenmeyers de 250 ml contendo 90 ml de solução salina (0.85%), agitando-se vigorosamente.
2. Após aproximadamente 1 hora de repouso, foram retiradas alíquotas de 1 ml do líquido sobrenadante e colocadas em tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina 0.85%.
3. Posteriormente, procederam-se diluições decimais e, a partir destas, efetuou-se o plaqueamento de 0,1ml por espalhamento com alça de Drigalski em placas de Petri, contendo cerca de 20 ml do meio de Hankin

(item 3.4.2. mod. 1) para obtenção de colônias monospóricas. As placas foram incubadas a 30°C por 5 dias. Este meio também foi utilizado para os posteriores isolamentos por ser um meio indicado para seleção de fungos produtores de enzimas pectinolíticas (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975).

3.5.2. Isolados de frutas

Foram utilizadas frutas como laranja, maracujá e uva já em processo de deterioração. Uma amostra do fungo causador desse processo foi retirada com auxílio de uma alça de platina. Cada amostra foi repicada e isolada em placa de Petri, contendo meio de cultura de Hankin (item 4.4.2. - Mod.1).

3.5.3. Nomenclatura utilizada para os isolados encontrados

Após obtenção de culturas puras, os isolados foram denominados de fungos pectinolíticos (FP) seguidas de números, com a finalidade de diferenciá-los (FP/01, FP/02,FP/101).

Dos 101 isolados, 84 linhagens são provenientes do solo (FP/01 ao FP/11; FP/27; FP/31 ao FP/101) e 17 foram advindas de frutas (FP/12 ao FP/26; FP/28 ao FP/30). As linhagens gentilmente cedidas para participarem da seleção quanto a atividade pectinolítica também receberam esta denominação sendo elas FP/102 a FP/108 descritas no item 3.1.2.

3.6. Seleção dos isolados em placas (meio sólido)

Entre as linhagens fúngicas isoladas neste trabalho e as já existentes no laboratório de Microbiologia Industrial do Agrupamento de Biotecnologia da Divisão de Química - IPT, totalizou-se um número de 108 linhagens, as quais receberam a denominação prévia de fungos pectinolíticos (FP).

Estes fungos foram avaliados quanto à produção de pectinases em placas contendo 20 ml do meio de cultura (item 3.4.2. Mod.1) para visualização do halo de degradação da pectina, segundo o Método Semi-Quantitativo estabelecido por HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975), cada um dos isolados foi repicado pontualmente no centro de 3 placas de Petri, estas foram incubadas a 30°C, por 72 horas. Porém, exceções foram feitas para alguns fungos cujo crescimento foi mais rápido, necessitando assim de menor tempo de incubação.

Após o período de incubação, os diâmetros das colônias foram medidos e, em seguida, cobriu-se a superfície das placas com aproximadamente 5 ml de solução aquosa de brometo de hexadeciltrimetilamônio a 1% (item 3.4.10), deixando-se em repouso por cerca de 20 a 30 minutos para que a reação substrato/solução pudesse ocorrer. Decorridos estes tempos, as placas foram esgotadas desta solução e as medidas do diâmetro total (halo + colônia) foram efetuadas. Com este procedimento, pode-se observar um halo translúcido ao redor da colônia.

Isto ocorre porque a solução utilizada precipita a pectina intacta ainda presente no meio, tornando-o opaco, e a zona mais clara, denominada halo de degradação, denota ter havido hidrólise da pectina por ação das enzimas secretadas pelo fungo.

Esta atividade enzimática foi expressa conforme dois critérios de avaliação:

a) Índice de relação enzimática (FUNGARO, 1990), dado por:

$$\text{I.R.E.} = D/d$$

onde:

D= diâmetro do halo + colônia (cm)

d= diâmetro da colônia (cm)

b) Área total de degradação (VICENTE, 1989), dado por:

$$\text{Área do halo} = \pi/4 \cdot (D^2 - d^2)$$

onde:

D= diâmetro do halo + colônia (cm)

d= diâmetro da colônia (cm)

Os valores obtidos para cada um dos fungos através desses dois critérios foram compilados.

3.7. Seleção dos isolados em cultura submersa

3.7.1. Produção de inóculo

A partir do crescimento dos fungos em tubos de ensaio contendo o meio ATCC-325 (item 3.4.1.), produziu-se uma suspensão com 8 ml de solução aquosa com Tween 80 (0.01%). Dessa suspensão, transferiu-se 1 ml para erlenmeyer de 1000 ml contendo 50 ml de meio sólido (item 3.4.2. - Mod.1), espalhando-se bem este volume na superfície do mesmo.

Uma vez inoculados, estes erlenmeyers foram incubados por cerca de 120 horas a 30°C. Decorrido este período, os esporos desenvolvidos foram suspensos também com solução de Tween 80 (0.01%), efetuando-se a contagem do número de esporos/ml da suspensão, em câmara de Neubauer, ao microscópio óptico.

A suspensão a ser incubada foi corrigida, quando necessário, para 10^7 esporos/ml.

3.7.2. Condições da fermentação

Estes testes foram realizados em erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura líquido, conforme item 3.4.2. Os

erlenmeyers foram inoculados com 1 ml da suspensão obtida de acordo com item 3.7.1., com concentração de 10^7 esporos/ml.

As culturas foram mantidas a 30°C, sob agitação constante (200 ciclos por minuto), durante 72 horas. Após este período, as amostras foram filtradas em papel Whatman nº 41 para retenção da massa celular e posterior medida de massa seca, procedendo-se às determinações de atividade enzimática e pH no filtrado.

3.8. Cinética de crescimento e avaliação da atividade enzimática dos isolados selecionados

Para estes testes foi adotado os mesmos procedimentos para produção de inóculo, bem como as mesmas condições de cultivo descritas nos itens 3.7.1. e 3.7.2., respectivamente. Entretanto, o ensaio foi acompanhado durante 120 horas, com amostragens a cada 24 horas, através das mesmas determinações mencionadas no item 3.7.2., ou seja, pH, massa seca e atividade enzimática.

3.9. Acompanhamento analítico dos ensaios

3.9.1. Determinação do crescimento micelial

A massa micelial foi separada por filtração, lavada com água destilada e seca em estufa a 60°C, por 48 horas. O crescimento de cada isolado foi avaliado pelo peso seco da biomassa.

3.9.2. Avaliação da atividade enzimática

A atividade enzimática extracelular no complexo pectinolítico de cada fungo foi avaliada como atividade diminuidora da viscosidade, que corresponde principalmente à atividade das substâncias pectnolíticas que clivam ligações glicosídicas ao acaso, no interior da molécula do substrato, causando uma diminuição da viscosidade relativa da solução deste.

3.9.2.1. Método viscosimétrico

A atividade diminuidora da viscosidade foi avaliada pelo método descrito por SAITO (1955) e modificada por MAIORANO (1990). Esta metodologia baseia-se na medida da redução de viscosidade de uma solução padronizada de pectina, conforme procedimento descrito a seguir.

3.9.2.1.1. Procedimento

- a) a solução de pectina (item 3.4.11.) deve permanecer em banho-maria a $30(\pm 0.1)^{\circ}\text{C}$, por cerca de 10 minutos, antes da análise ser iniciada.
- b) em frasco de amostra, misturaram-se rapidamente 8 ml da solução de pectina acima citada e 2 ml da solução enzimática (filtrada de cada fungo), obtida conforme item 3.7.2., agitando-se vigorosamente. Utilizando-se um cronômetro digital, a contagem do tempo de reação foi iniciada a partir do instante em que a solução enzimática entrou em contato com o substrato (solução de pectina).
- c) a seguir, a mistura de reação foi transferida imediatamente para um viscosímetro tipo Cannon-Fenske nº 150 (conforme ASTM/D-446), e incubada em banho termostático ajustado a $30,0 (\pm 0.1)^{\circ}\text{C}$.
- d) o tempo de escoamento da solução enzimática foi medido após exatamente 60 minutos, a partir do início da reação....
- e) paralelamente, como branco, inativaram-se as enzimas contidas em uma alíquota da solução enzimática por aquecimento em banho-maria em ebulição por 30 minutos, repetindo-se as etapas de a, b, c e d.

Para as leituras do tempo de escoamento sempre foi utilizado o mesmo viscosímetro, tanto para a solução enzimática como para o seu respectivo branco. Os viscosímetros foram calibrados com água destilada, nas mesmas condições de ensaio.

Após medidos todos os tempos de escoamento, calculou-se a porcentagem de redução de viscosidade, através da equação I:

$$\%Red = \frac{(Teb - Tea) \cdot 100}{(Tea - Teágua)} \quad (I)$$

onde:

Tea = Tempo de escoamento da amostra (segundos)

Teb = Tempo de escoamento do branco (segundos)

Teágua = Tempo de escoamento da água (segundos)

Uma unidade de atividade enzimática (1U), foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para diminuir em 50% a viscosidade inicial da solução do substrato, quando a 30°C por 60 minutos de reação.

3.9.2.1.2. Cálculo da atividade enzimática

Para a medida de atividade pectinolítica das enzimas secretadas pelos isolados foi necessário fazer uma curva de calibração imposta pelo método. MAIORANO *et al.* (1990) mencionam ainda que, quando se deseja comparar as atividades entre linhagens, deve-se utilizar da curva padrão da solução enzimática de cada uma das linhagens, para os posteriores cálculos de atividade enzimática. Neste caso, para as curvas durante a seleção, utilizou-se de apenas dois pontos, dado o elevado número de isolados, calculando-se, posteriormente, a equação da reta. Para os ensaios cinéticos as curvas foram feitas com maior número de pontos, calculando-se a regressão linear.

Para exemplificar a maneira utilizada para o cálculo da atividade pectinolítica, tomou-se por base os ensaios de seleção. Procedeu-se diluições na solução enzimática de cada isolado, para que fosse possível a obtenção de dois pontos com valores de porcentagens de redução acima e abaixo de 50%. A partir do log da diluição efetuada para cada um dos pontos, associados aos seus respectivos valores de porcentagem de redução (% Red), através da equação I, obtiveram-se os pontos de uma reta.

Os valores obtidos foram aplicados na equação II abaixo descrita, fornecendo o valor de concentração de enzima ([e]) necessária para redução de viscosidade em 50% que, por definição, representa o valor de uma unidade enzimática (1U):

$$\%Red = a_1 + b_1 \cdot \text{Log } [E]$$

$$[E] = 10^{\frac{(\%Red - a_1)}{b_1}} \quad (II)$$

onde:

a_1 e b_1 = Coeficientes angular e linear encontrados a partir da equação da reta entre os dados de (%) Red e Log da diluição empregada para os dois pontos indicados

$[E]$ = Concentração de enzima (%v/v)

O valor assim obtido, indica qual dos filtrados enzimáticos teve maior atividade pois, quanto maior o valor da diluição necessária para se obter 50% de redução, maior será a quantidade de enzima presente no mesmo.

A partir do valor da $[E]$, pode-se fazer uma relação entre a concentração de enzima, unidade de atividade enzimática e porcentagem de redução da viscosidade; calcularam-se os valores de (%Red) e $[E]$ para duas unidades enzimáticas (2U) pela fórmula II.

Os valores de $[E]$ para (1U) e (2U), juntamente com seus respectivos valores de %Red, foram utilizados para traçar uma nova curva, conforme a equação III abaixo descrita:

$$\%Red = (a_2 + b_2 \cdot \text{Log } U) \cdot d/v \quad (III)$$

$$\frac{(\%Red - a_2)}{b_2}$$

$$U = 10 \cdot d/v$$

onde:

a_2 e b_2 = Coeficientes linear e angular encontrados a partir da equação da reta entre os dois pontos de Log (1U) e Log (2U) e suas respectivas %Red

U = Unidade de atividade enzimática U/ml

d = Diluição efetuada no extrato enzimático referente ao valor de %Red utilizado

v = Volume de solução enzimática utilizada na análise (2 ml)

Através desta equação obteve-se o valor de unidade enzimática pectinolítica expressa em unidade por ml (U/ml).

3.10. Caracterização dos isolados selecionados

3.10.1. Classificação dos isolados

Os isolados mais promissores, selecionados em cultura submersa, quanto à produção de pectinases, foram encaminhados ao Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco-Recife, onde foram classificados pelos seguintes professores: Dra. Elza Áurea de Luna Alves Lima, Dra. Maria José dos Santos Fernandes e Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti.

3.10.2. Coloração de núcleos de conídio - técnica citológica (TANAKA et al., 1979, modificado por VEGA, 1990)

Nos isolados selecionados foram realizadas observações citológicas através da coloração de núcleos (com ligeiras modificações na técnica citológica), conforme procedimentos descritos a seguir, estimando-se o número de núcleos por esporos. Para estes estudos os isolados foram previamente cultivados em meio ATCC - 325 (item 3.4.1) durante 4 dias a 30°C.

3.10.2.1. Preparo da lâmina

Os esporos dos referidos isolados foram aderidos a lamínulas previamente pinceladas com albumina 50% e levemente secas em um bico de Bunsen. Posteriormente, foi efetuada a fixação deste material com metanol absoluto durante 15 minutos. Após a fixação, mergulharam-se rapidamente estas lamínulas em uma solução de hipoclorito 5% secando-se à temperatura ambiente. Depois de secas, as lamínulas foram colocadas para hidrólise ácida em solução HCl.1N em temperatura ambiente e 60°C por 7 minutos e 20 minutos, respectivamente. Lavou-se por três vezes consecutivas em água destilada e uma vez em tampão fosfato pH 6,9; os esporos foram corados por imersão em solução corante Giemsa, diluída de 1 para 9 com tampão fosfato pH 6,9; durante 30 minutos.

O excesso de corante foi retirado por lavagem com o mesmo tampão. A seguir, procedeu-se a montagem provisória em lâminas, vedando as bordas das lamínulas com esmalte incolor, procurando evitar bolhas de ar entre lâmina e lamínula.

Para observações microscópicas foi utilizado o microscópio marca Riechert - Modelo 120 - Série 100 23-7, associado ao sistema fotomicrográfico de mesma marca, quando necessário.

3.10.2.2. Determinação do número de núcleos por conídio

Conídios com o mesmo tempo de crescimento foram observados ao microscópio óptico e determinada a porcentagem média de núcleos por conídios. Para tanto, foram empregados 500 conídios para cada isolado.

3.11. Preservação dos fungos pectinolíticos

3.11.1. Preservação por liofilização

As linhagens de fungos produtores de pectinases foram preservadas por liofilização utilizando-se um processo no qual dissociou-se a

fase de congelamento da fase de secagem das amostras. As linhagens produtoras de pectinases, inicialmente liofilizadas, foram aquelas cedidas por laboratórios de pesquisa, listadas no item 3.1.2. Quanto as linhagens isoladas, foram mantidas pelo processo de liofilização somente aquelas selecionadas como mais promissoras: FP/21, FP/42, FP/46, FP/69, FP/76 e FP/83.

Para liofilização foi empregado o método descrito por KIRSOP (1984), conforme demonstrado através da Figura 7, a seguir. As linhagens foram cultivadas no meio descrito em materiais e métodos (item 3.4.1), durante 5 dias a 30°C. Dados de literatura indicaram como protetor para a liofilização de fungos uma solução de leite desnatado a 10% e inositol a 5% (SILVA, 1990).

Preparou-se uma suspensão adicionando-se 5 ml desta solução protetora à cultura, agitando-se suavemente para remover os esporos do meio. Aliquotas de 0,2 ml dessa suspensão foram distribuídas em ampolas esterilizadas e submetidas a um congelamento lento (1°C/min) em "Shell freezer" Labconco mod. 75250 até - 50°C, permanecendo a esta temperatura por mais duas horas após o congelamento.

A liofilização foi então realizada em "Tray-dryer" Labconco mod. 75150 durante cerca de 18 horas a -20°C e 5 mm de Hg, quando as ampolas foram transferidas para o "manifold" do aparelho para fechamento a vácuo utilizando-se maçarico.

Foram feitas determinações de viabilidade da suspensão de esporos antes do congelamento, após a liofilização e armazenamento. Para isto, semeou-se, por espalhamento com alça de Drigalski, 0,1 ml de diluições apropriadas de cada amostra, em placas de Petri contendo meio de cultura (item 3.4.1), em triplicata.

Após incubação a 30°C, procedeu-se a contagem de colônias (24 e 48 h), exprimindo-se o resultado em unidades formadoras de colônias por mililitro da amostra (UFC/ml). As ampolas foram armazenadas em refrigerador doméstico, sendo avaliadas periodicamente.

ESQUEMA PARA PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO

Figura 7. Esquema para o processo de liofilização.

Cada linhagem fúngica foi catalogada no Banco de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Industrial do Agrupamento de Biotecnologia (LMI/AB) do IPT, estando suas características descritas em planilhas apropriadas.

3.11.2. Preservação em nitrogênio líquido

As culturas foram obtidas em meio ATCC 325 sólido, 30°C após cultivo por cinco dias.

Empregou-se uma solução de glicerol a 10% como protetor contra danos resultantes do congelamento (KIRSOP, 1984). Os esporos foram suspensos na solução protetora e aliquotas de 0,05 ml da suspensão obtida foram distribuídos em tubos de plástico (30 mm de altura x 3 mm de diâmetro) selados em uma das extremidades, conforme descrito por KIRSOP & HENRY (1984).

Os canudinhos foram selados, acondicionados em frascos de polipropileno com tampa rosqueável e submetidos ao congelamento, baixando-se 1°C/mm até -50°C. Após 2h a -50°C passaram a ser estocados imersos em nitrogênio líquido em "containers" apropriados.

A viabilidade celular foi avaliada antes e depois do congelamento, efetuando-se acompanhamento periódico a fim de se determinar a eficiência deste método para as espécies estudadas. Para recuperação e contagem, as amostras foram descongeladas rapidamente por imersão e agitação em banho-maria a 37°C, procedendo-se como descrito no item anterior.

3.12. Sobrevivência à luz ultravioleta

Suspensão de conídios da linhagem selvagem FP/83 em tween 80 foi observada ao microscópio com auxílio de uma câmara de Neubauer, para se estimar o número de conídios por mililitro. Esta solução foi diluída em solução salina para concentração final de 1×10^6 conídios por ml, colocada em placa de Petri esterilizada, e irradiada com luz ultravioleta (marca MINERALIGHT - mod. R 52 - ULTRA-VIOLET Prod. INC. USA - 60 Amps.), em diferentes tempos de exposição a uma distância de 12,5 cm da lâmpada.

A seguir, após cada período de irradiação, uma alíquota de 1 ml foi retirada da placa. Essas alíquotas, assim como as do controle, foram convenientemente diluídas em solução salina 0,85% e 0,1 ml de cada solução foi semeado em placas contendo meio completo (item 3.4.4) e 0,1% de desoxicolato de sódio, e incubados a 30°C em ausência de luz por 5 dias.

Após este período, as colônias isoladas foram contadas e procedeu-se o cálculo da curva de sobrevivência, tomando-se o número de colônias obtidas no tempo 0 (zero) minutos como 100% de sobrevivência. Foi estimado deste modo, o tempo de irradiação que permite 5% de sobrevivência para a linhagem.

3.12.1. Isolamento de mutantes morfológicos

Após a determinação do tempo de irradiação que permitisse a sobrevivência de 5% dos conídios, procedeu-se nova irradiação neste tempo, do mesmo modo conforme descrito no item 3.9.5.. A suspensão irradiada foi diluída seriadamente. De cada diluição semeou-se 0,1 ml por placa de Petri contendo meio completo (item 3.4.4) e incubou-se a 30°C por 5 dias. As colônias com alterações morfológicas encontradas foram isoladas por réplica em meio completo e utilizadas nos testes.

3.12.2. Teste de reversão

As linhagens mutantes foram repicadas por um ponto no centro de 10 placas de Petri contendo meio estoque ATCC-325 (item 3.4.1). Nestas procurou-se observar alterações morfológicas e presença de setores.

3.13. Testes posteriores

Os mutantes foram selecionados em cultura submersa, conforme descrição no item 3.7., sendo sua produção enzimática avaliada segundo o item 3.8., o que permitiu comparar o mutante mais promissor em relação a seu parental.

3.14. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos a uma análise de variância utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado. Para a correlação entre as variáveis obtidas na seleção em meio sólido e líquido foi utilizado o Coeficiente de Correlação Simples. Também foram obtidos os seguintes Índices de Seleção:

- IC (Índice Clássico), obtidos pelo método clássico de SMITH (1936);
- IH* (Índice das Herdabilidades) e;
- IUTMS (produto das variáveis: unidade enzimática e massa celular seca obtidas em meio de cultura líquida)**.

* Índice proposto por SOUZA JR. (não publicado), comunicação pessoal feita à FERNANDES, J. S. C.

** Índice proposto por FERNANDES, J. S. C., comunicação pessoal feita à LOPES-SHIKIDA, S. A. R.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento dos fungos

O primeiro passo no desenvolvimento e melhoramento de um processo de produção industrial para enzimas pectinolíticas é a busca por linhagens produtivas (ROMBOUTS & PILNIK, 1980). Nesse sentido, foram efetuadas coletas de solo e fontes naturais onde procedeu-se o isolamento e posterior seleção entre os isolados. Para a detecção daqueles mais promissores na produção de enzimas pectinolíticas, lançou-se mão do método de seleção em placas (meio sólido) e posteriormente da seleção em cultura submersa.

No isolamento inicial dos fungos utilizou-se o meio cultura de HANKIN-Mod 1 item (3.4.2.). Tal meio de cultivo foi adotado por ser indicado para seleção de fungos pectinolíticos (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975). As colônias morfológicamente distintas, crescidas neste meio, foram transferidas para um novo meio para obtenção de colônias monospóricas puras. Como resultado dos isolamentos de solo e fontes naturais, foram obtidos um total de 102 linhagens fúngicas potencialmente pectinolíticas. Estas encontram-se discriminadas na Tabela 2.

Entre os isolados purificados observou-se uma grande variabilidade morfológica, indicando a obtenção de diversos gêneros, ocorrendo com maior frequência representantes dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. As 102 linhagens obtidas são potencialmente pectinolíticas, pois foram isoladas em meio seletivo. Tais linhagens foram submetidas a um processo de seleção com a finalidade de se obter indicações daquelas mais promissoras.

Tabela 2. Procedência dos isolados obtidos em diferentes coletas de solos e fontes naturais

Local de Origem	Fonte	Isolados
SPV Sítio Paredão Vermelho Arthemís/S.P.	Solo	FP/01 - FP/02 - FP/03 - FP/04 - FP/05 - FP/06 - FP/07 - FP/08 - FP/09 - FP/10 - FP/11 - FP/27 - FP/31 - FP/32 - FP/33 - FP/34 - FP/35 - FP/36 - FP/37 - FP/38 - FP/39 - FP/40 - FP/41 - FP/42 - FP/43 - FP/44 - FP/45 - FP/46 - FP/47 - FP/48 - FP/49 - FP/50 - FP/51 - FP/52 - FP/53 - FP/54 - FP/55 - FP/56 - FP/57 - FP/58 - FP/59 - FP/60 - FP/61 - FP/62 - FP/63 - FP/64 - FP/65 - FP/66 - FP/67 - FP/68 - FP/71 - FP/72 - FP/73 - FP/74 - FP/74 - FP/88 - FP/89 - FP/90 -
FMB Fazenda Monte Belo Colina/S.P.	Solo	FP/69 - FP/70 - FP/77 - FP/78 - FP/79 - FP/80 - FP/81 - FP/82 - FP/83 - FP/84 - FP/85 - FP/86 - FP/87 - FP/93 - FP/94 - FP/95 - FP/96 - FP/97 - FP/98 - FP/99 - FP/100 - FP/101
Jardim Doméstico São Paulo/S.P.	Solo	FP/75 - FP/76 - FP/91 - FP/92 -
Fontes Naturais (Frutas em Deterioração)	Uva	FP/12 - FP/13 - FP/14 - FP/15 - FP/16 - FP/17
	Maracujá	FP/18 - FP/19 - FP/20 - FP/21 - FP/23 - FP/24 - FP/25 - FP/26
	Laranja	FP/22 - FP/28 - FP/29 - FP/30 -

4.2. Seleção dos isolados quanto a produção de enzimas pectínicas específicas

Considerando o mercado para pectinases para uso em processos (US\$ 165 milhões/ano), é surpreendente que existam poucos exemplos onde a produção tenha sido otimizada pelo isolamento de linhagens de fungos e bactérias hiper produtoras (FORGART & KELLY, 1983).

Segundo DURRANDS & COOPER (1988), isto talvez ocorra devido aos meios de seleção ainda serem deficientes, pois muitas vezes se utilizam de altos níveis de fonte de energia, podendo com isto causar o efeito de repressão catabólica. Outro ponto importante é que frequentemente estes meios não são tamponados e, portanto, ficam sujeitos a pH flutuante durante o cultivo. Assim sendo, ressaltam a importância em superar estas deficiências, além de cautela na interpretação dos resultados.

4.2.1. Seleção em placas (meio sólido)

As técnicas de difusão em ágar são empregadas para detecção da atividade enzimática (SCRIBAN, 1985), tendo sido utilizada inicialmente no presente trabalho. A avaliação da produção de exoenzimas em placas consiste na hidrólise da pectina presente no meio, permitindo avaliar qualitativamente a produção de enzimas extracelulares através da visualização de halo no meio. Esta produção tem sido estimada pelo índice de relação enzimática, que consiste na razão da medida do diâmetro total (colônia + halo) pelo diâmetro das colônias (BERTOLINI, 1987; ROUMAS, 1988; VALADARES, 1989). Contudo, VICENTE (1989) considerou que, para melhor expressar a capacidade de degradação dos fungos, deve-se avaliar a área total de degradação e a área de crescimento da colônia, conforme fórmula apresentada no item (3.6.). Tal procedimento forneceu-lhe uma estimativa mais precisa em relação ao índice enzimático.

Tendo em vista os diferentes pontos apresentados, as linhagens isoladas neste trabalho, bem como aquelas advindas de coleções de cultura, foram selecionadas quanto à capacidade hidrolítica pelo teste semi quantitativo em placas baseado em HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975) conforme item (3.6.), e foram avaliados segundo os dois critérios aqui apresentados.

Os resultados obtidos (conforme Tabela 3), foram comparados com a linhagem FP/107 de *Aspergillus oryzae*, empregada como referência neste caso. A linhagem FP/107 foi utilizada por MAIORANO (1990) em estudos de produção de pectinase, por fermentação em estado semi-sólido e submerso, a qual apresentou resultados reprodutíveis alcançando uma produtividade de

10,74 U/gms.h em pH 3,6 no tempo de 48 horas, e 13,26 U/ml em pH semelhante no tempo de 96 horas, respectivamente.

TABELA 3: Seleção dos isolados selvagens pelo método semiquantitativo (meio sólido), utilizando-se dois critérios de avaliação: Índice de Relação Enzimática (IRE) e Área de Degradação Enzimática (ADE). Os dados representam a média de 3 repetições, no tempo de 72 horas, as medidas em diâmetro ($\varnothing$) são dadas em cm.

Linhagem	$\varnothing$ da colônia (cm)	$\varnothing$ do halo (cm)	Índice de Relação	Área de Degr. Enz.
			Enz.	(cm ²)
FP/1	2,46	3,60	1,46	5,40
FP/2	0,60	1,90	<u>3,17</u>	2,55
FP/3	2,63	3,47	1,32	3,98
FP/4	1,63	1,73	1,06	026
FP/5	3,20	3,20	1,00	0
FP/6	2,00	3,87	1,87	8,39
FP/7	1,57	1,70	1,08	0,35
FP/8	1,43	1,80	1,25	0,92
FP/9	1,27	1,27	1,00	0
FP/10	0,53	0,53	1,00	0
FP/11	1,47	2,13	1,45	1,88
FP/12	6,30	7,17	1,14	8,14
FP/13	4,10	5,10	1,24	7,25
FP/14	2,73	4,20	1,55	7,96
FP/15	3,90	4,97	1,27	7,43
FP/16	4,30	4,30	1,00	0
FP/17	4,17	5,13	1,23	7,05
FP/18	5,43	5,70	1,04	2,33
FP/19	4,17	4,27	1,02	0,66
FP/20	5,53	6,13	1,11	5,44
FP/21	1,20	1,93	1,63	1,79
FP/22	1,47	2,17	1,48	2,00
FP/23	2,90	3,63	1,25	3,75
FP/24	4,80	5,86	1,22	8,91
FP/25	4,70	5,00	1,06	2,29
FP/26	2,23	3,20	1,42	4,13
FP/27	0,63	2,33	<u>3,68</u>	3,99
FP/28	4,30	4,50	1,04	1,38
FP/29	3,33	3,57	1,07	1,26
FP/30	5,23	6,07	1,16	7,37
FP/31	3,10	4,10	1,32	5,65
FP/32	4,60	5,63	1,23	8,31
FP/33	4,77	5,67	1,19	7,37
FP/34	4,27	5,23	1,23	7,19

continua...

continuação tabela 3

Linhagem	Ø da colônia (cm)	Ø do halo (cm)	Índice de Relação	Área de Degr.
			Enz.	Enz.(cm ²)
FP/35	4,27	4,63	1,08	2,55
FP/36	1,00	2,13	<u>2,15</u>	2,80
FP/37	1,83	1,83	1,00	0
FP/38	2,63	4,17	1,58	8,22
FP/39	3,30	4,20	1,27	5,28
FP/40	4,27	5,13	1,21	6,35
FP/41	4,73	5,67	1,20	0
FP/42	4,97	5,90	1,19	7,97
FP/43	5,37	6,17	1,15	7,25
FP/44	4,70	5,67	1,20	7,86
FP/45	3,20	4,17	1,30	5,59
FP/46	3,47	4,47	1,29	6,22
FP/47	4,80	5,83	1,21	8,62
FP/48	4,70	5,77	1,23	8,74
FP/49	4,40	5,53	1,26	8,84
FP/50	4,00	4,40	1,10	2,62
FP/51	3,50	3,80	1,09	1,66
FP/52	4,43	4,80	1,08	2,65
FP/53	1,43	1,97	1,37	1,35
FP/54	3,20	3,50	1,59	5,85
FP/55	1,63	2,20	1,34	1,71
FP/56	5,43	2,97	1,11	4,59
FP/57	1,97	2,07	1,05	0,32
FP/58	1,33	1,90	1,43	1,44
FP/59	3,10	4,23	1,36	6,53
FP/60	3,57	4,53	1,27	6,17
FP/61	1,33	2,47	1,86	3,38
FP/62	2,50	3,17	1,27	3,30
FP/63	2,40	2,70	1,14	1,32
FP/64	0,83	2,90	<u>3,49</u>	6,08
FP/65	1,43	2,73	1,93	3,03
FP/66	1,53	3,00	1,96	5,23
FP/67	2,33	3,43	1,47	4,98
FP/68	1,17	1,17	1,00	0
FP/69	4,17	4,90	1,18	5,22
FP/70	2,23	3,33	1,49	4,81
FP/71	4,50	5,23	3,49	5,62
FP/72	4,27	4,70	1,10	3,06
FP/73	2,43	3,77	1,51	5,92
FP/74	2,50	2,77	1,10	1,12
FP/75	5,96	6,07	1,02	0,95
FP/76	5,40	6,10	1,14	6,61
FP/77	5,37	5,37	1,00	0
FP/78	5,20	6,33	1,22	<u>10,33</u>
FP/79	5,00	5,77	1,15	6,49
FP/80	5,00	5,83	1,17	7,09
FP/81	4,90	5,70	1,16	6,66

continua , ..

continuação tabela 3

Linhagem	Ø da colônia (cm)	Ø do halo (cm)	Índice de Relação Enz.	Área de Degr. Enz. (cm ²)
FP/82	0,77	1,33	1,66	1,20
FP/83	6,13	6,13	1,00	0
FP/84	5,47	6,23	1,14	7,04
FP/85	0,90	1,03	1,08	0,20
FP/86	4,53	4,90	1,08	2,71
FP/87	5,97	6,57	1,10	5,88
FP/88	3,90	4,90	1,26	6,91
FP/89	1,03	2,00	1,94	2,30
FP/90	6,90	7,60	1,10	7,98
FP/91	5,10	5,37	1,05	2,18
FP/92	4,73	4,73	1,00	0
FP/93	1,57	2,87	1,84	4,51
FP/94	0,67	1,40	2,05	1,45
FP/95	0,93	1,87	2,00	2,08
FP/96	4,47	4,87	1,09	2,96
FP/97	3,87	5,00	1,29	7,89
FP/98	3,30	3,50	1,06	1,06
FP/99	0,47	2,27	<u>4,89</u>	5,31
FP/100	1,30	1,63	1,25	0,81
FP/101	3,67	3,87	1,05	1,18
FP/102	3,57	5,43	1,53	<u>13,35</u>
FP/103	3,67	5,33	1,46	<u>11,77</u>
FP/104	4,67	5,83	1,25	9,63
FP/105	3,20	5,03	1,57	<u>11,85</u>
FP/106	3,77	5,30	1,41	<u>10,92</u>
FP/107 (Padrão)	3,27	3,53	1,08	1,41
FP/108	4,07	4,07	1,00	0

Na Tabela 3 observa-se, nas duas últimas colunas, os 5 melhores resultados obtidos, segundo os dois critérios de avaliação, quando comparados com a linhagem padrão FP/107. Estes valores encontram-se sublinhados, sendo FP/99; FP/27; FP/64; FP/02 e FP/36 os melhores quanto ao Índice de Relação Enzimática (IRE) apresentando valores como 4,89; 3,68; 3,53, 3,17 e 2,15, respectivamente. Aqueles com os maiores valores de Área de Degradação Enzimática (ADE) foram FP/102; FP/105; FP/103; FP/106 e FP/78, com valores de 13,35; 11,85; 11,77; 10,92 e 10,33, respectivamente.

Na avaliação, utilizando o Índice de Relação Enzimática como critério de seleção, observou-se que 75% dos isolados apresentaram valores superiores a 1.08, valor obtido pela linhagem padrão FP/107 usada como padrão. Através do critério de avaliação dado pela Área de Degradação

Enzimática obteve-se 73% dos isolados apresentando valores superiores a 1.41, valor este obtido pela linhagem padrão FP/107. Embora os valores em percentagem estejam próximos, a correlação estimada entre os dois critérios de seleção em meio sólido foi de 0,32* ($P < 0,05$), indicando portanto, uma correlação muito baixa, o que significa que os melhores resultados obtidos por um apontam linhagens diferentes daquelas indicadas pelo outro critério.

Na Tabela 3 pode-se observar ainda que as linhagens apresentado crescimento reduzido, ou seja, com diâmetro de colônia inferior a 2cm, representando 27% do total de isolados, são as linhagens que em geral tiveram valores de área de degradação muito baixos. Entretanto, entre estas, linhagens encontram-se 4 daquelas indicadas como mais promissoras pelo Índice de Relação Enzimática.

Tais distorções nos resultados advêm provavelmente das diferentes interpretações que os dois critérios impõem, pois considerando que uma colônia de tamanho maior pode produzir, mesmo que o diâmetro de seu halo seja menor, maior área degradada de pectina em relação a uma colônia menor, que expresse um halo considerável. Poder-se-ia dizer que talvez o critério de avaliação por área degradada fosse o mais apropriado, como sugere VICENTE (1989). Entretanto, uma colônia pequena que apresente um halo surpreendente, pode indicar que a linhagem tem grande capacidade de secreção ou que a potência das enzimas liberadas seja superior a outras que expressem halos menores.

Contudo, em atividades enzimáticas alteradas, podem estar envolvidos mecanismos de síntese e/ou excreção. Segundo MONOSCO (1987), colônias pequenas, porém com massa micelial densa, compactadas, poderiam apresentar maior número de núcleos por unidade de área, resultando em uma produção enzimática maior, proporcionalmente ao tamanho da colônia. Em *Aspergillus nidulans*, o referido autor relatou ainda que linhagens de menor crescimento apresentaram os maiores índices enzimáticos para lipase, amilase e protease. VALADARES (1989) relatou que recombinantes de *Metarhizium anisopliae* com crescimento reduzido, apresentavam maiores médias de índice amilolítico.

Assim, os resultados obtidos e sumarizados na tabela 3 foram submetidos a uma análise de variância (item 3.14), onde se analisou as características observadas nos dois critérios de avaliação, ou seja, Índice de Relação Enzimática (IRE) e Área de Degradação Enzimática (ADE), conforme denominados no item 3.6. As tabelas 4 e 5 apresentam, respectivamente, o quadro da análise de variância bem como o teste Tukey para as médias de cada caráter utilizado na avaliação desse experimento.

Através das análises de variância (tabelas 4 e 5), observa-se a existência de uma ampla variabilidade genética entre as linhagens para os dois parâmetros analisados (IRE e ADE), sendo $F = 87,01^{**}$ e $9,74^{**}$ (significativos a 1%), respectivamente. Esta variabilidade foi confirmada pelas Herdabilidades no sentido amplo, ou grau de determinação genético, que é dado pela proporção da variância fenotípica (σ^2_F), determinada pela variância genética (σ^2_G). Tais valores, para as características avaliadas (IRE e ADE), foram muito altas, sendo 96,6% e 74,5% para cada caráter, respectivamente. Isso significa que existe uma variabilidade genética muito grande para estas características e que se a seleção fosse feita para alguma delas, o progresso esperado com a seleção seria muito grande.

Desse modo, na hipótese de que a razão entre o diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia denominado de Índice (IRE), e a área da colônia pela área do halo denominado de ADE, fossem bons para se medir o potencial dos fungos na produção de pectinases, foi feito um estudo de correlação entre estes (conforme item 3.14). A correlação estimada entre os dois critérios de seleção em meio sólido foi de $0,32^*$ (significativo a 5,0% de probabilidade), portanto muito baixa. Estes resultados, de certa forma, poderiam justificar as diferenças obtidas entre as linhagens avaliadas pelos dois critérios de seleção em meio sólido.

Entretanto, só existiria interesse em selecionar para algum desses caracteres se houvesse uma boa correlação entre esses e os caracteres analisados em cultura submersa, na hipótese desses últimos possivelmente estarem mais próximos da real capacidade dos fungos em produzir pectinases. Sendo assim, as linhagens que foram significativamente ($P < 0,05$) superiores a linhagem padrão FP/107 apontado pelo Teste de Tukey (tabelas 4 e 5) foram submetidas a seleção em cultura submersa.

TABELA 4: Análise de variância do parâmetro Índice de Relação Enzimática (IRE), analisado em meio sólido e resultados do Teste de Tukey para as linhagens fúngicas avaliadas (3 repetições).

Causas da Variação	G.L.	Q.M.	Valor F	Prob. > F
Isolados	107	0.9454890	87.0119	0.00001
Resíduo	216	0.0108662		
Total	323			
Média Geral = 1.375468				
Coeficiente de variação = 7.579%			h^2 (estimado) = 0,966	

Linhagens	Médias	Contraste (5%)
FP/99	4.889	a
FP/27	3.682	b
FP/64	3.530	bc
FP/02	3.167	c
FP/36	2.150	d
FP/94	2.055	d
FP/95	2.000	de
FP/66	1.957	def
FP/89	1.939	def
FP/65	1.934	def
FP/06	1.873	defg
FP/61	1.860	defgh
FP/93	1.839	defghi
FP/82	1.657	efghij
FP/21	1.627	efghijk
FP/54	1.590	fghijkl
FP/38	1.582	fghijklm
FP/105	1.573	fghijklmn
FP/14	1.544	ghijklmno
FP/102	1.530	ghijklmnop
FP/73	1.508	ghijklmnopq
FP/70	1.493	ghijklmnopqr
FP/22	1.479	hijklmnopqrs
FP/67	1.473	hijklmnopqrst
FP/01	1.459	ijklmnopqrstu
FP/11	1.458	ijklmnopqrstu
FP/103	1.457	ijklmnopqrstu
FP/26	1.433	jklmnopqrstuv
FP/58	1.428	jklmnopqrstuv
		continua...

continuação da tabela 4

Linhas	Médias	Contraste (5%)
FP/106	1.407	jklmnopqrstuvw
FP/53	1.371	jklmnopqrstuvw
FP/59	1.367	jklmnopqrstuvw
FP/55	1.349	jklmnopqrstuvw
FP/31	1.324	jklmnopqrstuvw
FP/03	1.318	jklmnopqrstuvw
FP/45	1.302	jklmnopqrstuvw
FP/86	1.299	jklmnopqrstuvw
FP/97	1.293	jklmnopqrstuvw
FP/46	1.290	jklmnopqrstuvw
FP/39	1.277	jklmnopqrstuvw
FP/15	1.273	jklmnopqrstuvw
FP/60	1.271	jklmnopqrstuvw
FP/62	1.266	klmnopqrstuvw
FP/08	1.265	klmnopqrstuvw
FP/49	1.258	klmnopqrstuvw
FP/23	1.245	klmnopqrstuvw
FP/104	1.250	klmnopqrstuvw
FP/100	1.250	klmnopqrstuvw
FP/88	1.246	klmnopqrstuvw
FP/13	1.244	klmnopqrstuvw
FP/17	1.233	lmnopqrstuvw
FP/48	1.229	lmnopqrstuvw
FP/34	1.229	lmnopqrstuvw
FP/32	1.225	lmnopqrstuvw
FP/24	1.224	lmnopqrstuvw
FP/78	1.217	lmnopqrstuvw
FP/47	1.216	lmnopqrstuvw
FP/44	1.206	lmnopqrstuvw
FP/40	1.206	lmnopqrstuvw
FP/41	1.197	mnopqrstuvw
FP/33	1.189	nopqrstuvw
FP/42	1.188	nopqrstuvw
FP/69	1.176	opqrstuvw
FP/80	1.167	opqrstuvw
FP/81	1.163	opqrstuvw
FP/71	1.163	opqrstuvw
FP/30	1.160	opqrstuvw
FP/79	1.153	pqrstuvw
FP/43	1.149	pqrstuvw
FP/85	1.148	pqrstuvw
FP/63	1.141	qrstuvw
FP/84	1.140	qrstuvw
FP/12	1.139	qrstuvw
FP/76	1.137	qrstuvw
FP/20	1.110	rstuvw
		continua...

continuação da tabela 4

Linhas	Médias	Contraste (5%)
FP/56	1.107	rstuvw
FP/74	1.106	stuvw
FP/72	1.104	stuvw
FP/87	1.101	stuvw
FP/90	1.101	stuvw
FP/50	1.101	stuvw
FP/51	1.091	tuvw
FP/96	1.090	tuvw
FP/35	1.087	uvw
FP/07	1.084	uvw
FP/52	1.083	uvw
FP/107	1.083	uvw
FP/29	1.070	vw
FP/25	1.064	vw
FP/04	1.062	vw
FP/98	1.062	vw
FP/101	1.055	vw
FP/91	1.053	vw
FP/57	1.052	vw
FP/18	1.049	vw
FP/28	1.047	vw
FP/19	1.024	vw
FP/75	1.017	w

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

TABELA 5: Análise de variância do parâmetro Área de Degradação Enzimática (ADE) analisado em meio sólido e resultado do Teste de Tukey para as linhagens fúngicas avaliadas (três repetições).

Causas da Variação	G.L.	Q.M.	Valor F	Prob. > F
Isolados	107	33.7500464	9.7394	0.00001
Resíduo	216	3.46530722		
Total	323			

Média Geral = 4.520565

Coeficiente de variação = 41.179 %

 h^2 (estimado) = 0,745

continua...

continuação da tabela 5

Linhagens	Médias	Contraste (5%)
FP/102	13.351	a
FP/105	11.856	ab
FP/103	11.769	ab
FP/106	10.921	abc
FP/78	10.335	abcd
FP/104	9.631	abcde
FP/12	9.141	abcdef
FP/24	8.906	abcdefg
FP/49	8.843	abcdefgh
FP/48	8.738	abcdefghi
FP/47	8.620	abcdefghij
FP/06	8.393	abcdefghijk
FP/32	8.306	abcdefghijkl
FP/38	8.220	abcdefghijklm
FP/90	7.982	abcdefghijklmn
FP/42	7.969	abcdefghijklmno
FP/14	7.964	abcdefghijklmno
FP/97	7.890	abcdefghijklmno
FP/44	7.861	abcdefghijklmno
FP/41	7.618	abcdefghijklmnop
FP/15	7.429	abcdefghijklmnopq
FP/33	7.374	abcdefghijklmnopq
FP/30	7.374	abcdefghijklmnopq
FP/43	7.251	abcdefghijklmnopqr
FP/13	7.225	abcdefghijklmnopqr
FP/34	7.186	abcdefghijklmnopqrs
FP/80	7.092	abcdefghijklmnopqrst
FP/84	7.045	abcdefghijklmnopqrst
FP/17	7.045	abcdefghijklmnopqrst
FP/88	6.710	abcdefghijklmnopqrst
FP/81	6.660	abcdefghijklmnopqrst
FP/76	6.607	abcdefghijklmnopqrst
FP/59	6.534	abcdefghijklmnopqrst
FP/79	6.490	abcdefghijklmnopqrst
FP/40	6.356	bcdefghijklmnopqrst
FP/46	6.225	bcdefghijklmnopqrst
FP/60	6.165	bcdefghijklmnopqrst
FP/64	6.084	bcdefghijklmnopqrst
FP/73	5.924	bcdefghijklmnopqrst
FP/87	5.885	bcdefghijklmnopqrst
FP/54	5.856	bcdefghijklmnopqrst
FP/31	5.655	cdefghijklmnopqrst
FP/71	5.623	cdefghijklmnopqrst
FP/45	5.594	cdefghijklmnopqrst
FP/20	5.445	cdefghijklmnopqrst
FP/01	5.403	cdefghijklmnopqrst

continua...

continuação da tabela 5

Linhagens	Médias	Contraste (5%)
FP/39	5.280	cdefghijklmnopqrst
FP/69	5.225	cdefghijklmnopqrst
FP/66	5.225	cdefghijklmnopqrst
FP/67	4.977	cdefghijklmnopqrst
FP/70	4.809	defghijklmnopqrst
FP/56	4.586	defghijklmnopqrst
FP/93	4.516	defghijklmnopqrst
FP/65	4.233	defghijklmnopqrst
FP/26	4.134	defghijklmnopqrst
FP/27	3.992	efghijklmnopqrst
FP/03	3.987	efghijklmnopqrst
FP/99	3.974	efghijklmnopqrst
FP/23	3.754	efghijklmnopqrst
FP/61	3.377	fghijklmnopqrst
FP/72	3.066	fghijklmnopqrst
FP/62	2.974	fghijklmnopqrst
FP/96	2.932	fghijklmnopqrst
FP/36	2.796	fghijklmnopqrst
FP/86	2.710	fghijklmnopqrst
FP/52	2.657	ghijklmnopqrst
FP/50	2.623	ghijklmnopqrst
FP/35	2.558	ghijklmnopqrst
FP/02	2.552	ghijklmnopqrst
FP/18	2.330	ghijklmnopqrst
FP/89	2.301	ghijklmnopqrst
FP/25	2.285	ghijklmnopqrst
FP/91	2.178	hijklmnopqrst
FP/95	2.073	hijklmnopqrst
FP/22	1.997	ijklmnopqrst
FP/11	1.884	jklmnopqrst
FP/21	1.796	klmnopqrst
FP/55	1.709	lmnopqrst
FP/51	1.657	lmnopqrst
FP/58	1.442	mnopqrst
FP/53	1.434	mnopqrst
FP/107	1.408	mnopqrst
FP/28	1.382	nopqrst
FP/94	1.325	nopqrst
FP/63	1.325	nopqrst
FP/29	1.264	opqrst
FP/82	1.202	opqrst
FP/101	1.173	opqrst
FP/74	1.120	opqrst
FP/98	1.068	pqrst
FP/75	0.950	qrst
continua...		

continuação da tabela 5

Linhagens	Médias	Contraste (5%)
FP/08	0.919	qrst
FP/100	0.806	qrst
FP/19	0.662	rst
FP/07	0.356	st
FP/57	0.317	t
FP/04	0.264	t
FP/85	0.204	t

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

4.2.2. Seleção em cultura submersa

Na busca de maiores esclarecimentos, as linhagens fúngicas isoladas foram avaliadas em cultura submersa conforme item (3.7.), e selecionadas segundo sua produtividade enzimática nas mesmas condições de meio de cultura, temperatura, e tempo de incubação quando avaliadas em placas (meio sólido).

Entretanto, o meio de cultura original foi tamponado como descrito no item (3.4.2. Mod.2), pois verificou-se na literatura a importância que o controle do pH impõe. No meio de HANKIN e ANAGNOSTAKIS (1975), preparado como originalmente, constatava-se um pH em torno de 3,5 - 3,7. Tal pH tem sido indicado como faixa ótima para biossíntese da enzimas pectinolíticas, tanto para fermentação submersa como para semi-sólida (FUMIAN, 1987; MAIORANO, 1990), respectivamente.

FRIDUREK (1981), avaliando a síntese do complexo pectinolítico por *Aspergillus niger* 71 em condições de cultivo submerso, verificou que a produção de enzimas pectinolíticas dependiam não somente do pH do meio de fermentação mas também do tipo de tampão utilizado. Nas condições experimentais utilizadas obteve uma máxima produção de poligalacturonase em pH 4,0-4,5 e tampão McIlvaine. Dessa forma, utilizou-se o meio de Hankin para a seleção em cultura submersa adotando o pH 3.6., tamponado com o tampão de McIlvaine, conforme indicado no item (3.4.2. Mod.2).

O emprego da avaliação em cultura submersa visava inicialmente observar a existência de alguma correlação entre seus resultados e o Índice de Relação Enzimática ou a Área de Degradação Enzimática, que foram os parâmetros avaliados na seleção em placas (meio sólido), já que com frequência são encontrados na literatura relatos sobre a existência de correlação entre testes semiquantitativos (meio sólido) e quantitativos (meio líquido).

MANDELS (1975) e MONTENECOURT & EVELEIGH (1977), descreveram que linhagens de *Trichoderma reesei* QM6a e a mutante QM9414, apresentaram correlação entre os resultados obtidos em meio sólido e líquido, indicando, assim, a validade do uso de técnicas semi-quantitativas para "screening" rápidos. Tal correlação também foi efetiva para isolados selvagens de fungos filamentosos (BERTOLINI, 1987) e para *Humicola* sp (ROUMAS, 1988), quando avaliados bioquimicamente quanto a atividade celulolítica.

Entretanto, esta correlação positiva entre os parâmetros avaliados em meio sólido e líquido, quando se estudou a produção de enzimas do complexo celulolítico entre linhagens selvagens e/ou específicas, poderia não ser verdadeira quando se avalia a produção de outros complexos enzimáticos. Assim sendo, na busca de maior clareza, as oitenta e sete linhagens indicadas na primeira seleção (meio sólido) que apresentaram-se significativamente ($P < 0,05$) superiores à linhagem (FP/107) foram avaliadas em cultura submersa, onde foi estabelecido previamente um critério de seleção para corte (percentagem de redução da viscosidade maior ou igual a 50%).

Dentre as 87 linhagens avaliadas em cultura submersa, apenas 31 apresentaram níveis de redução de viscosidade da pectina superior a 50%, tendo sido as demais descartadas. Os resultados obtidos foram sumarizados na tabela 6. Nesta, observa-se que apenas 25,8% dos isolados (oito linhagens) apresentaram valores de atividade específica (Uesp) maiores que a linhagem padrão (FP/107), que foi de 647,53 Uesp, e cerca de 87% das linhagens (27 isolados) apresentaram valores de Utotal superiores a linhagem referência (FP/107), que foi de 32,83 UTotal.

TABELA 6: Seleção em cultura submersa das linhagens selvagens (medidas de atividade enzimática no tempo de 72 horas).

Linhagens	U total (un. x 50 ml)	U esp. (U total/g m.seca)	pH final
FP/17	34,75	414,00	3,45
FP/20	111,75	377,00	5,72
FP/21	66,19	1833,52	3,54
FP/24	119,25	481,00	5,91
FP/30	165,75	222,00	6,55
FP/31	177,00	618,00	4,08
FP/32	115,06	158,00	3,96
FP/33	61,00	294,00	5,82
FP/34	75,08	286,00	3,64
FP/38	30,39	602,98	3,57
FP/39	169,64	1156,37	3,28
FP/40	153,34	639,98	3,71
FP/42	275,65	1129,71	3,81
FP/43	59,81	202,27	3,70
FP/44	56,57	189,32	5,66
FP/45	127,49	584,01	3,74
FP/46	209,75	861,75	4,77
FP/50	56,83	499,82	3,78
FP/51	59,52	517,56	3,76
FP/52	58,11	504,43	3,78
FP/53	73,58	958,07	3,46
FP/60	24,18	591,19	3,43
FP/69	125,06	1591,04	3,02
FP/70	35,32	511,14	3,30
FP/71	35,22	422,81	3,90
FP/72	62,47	517,13	3,19
FP/76	53,22	1482,45	3,57
FP/79	33,84	446,44	3,80
FP/83	57,70	1259,83	3,53
FP/88	24,14	511,44	3,13
FP/107 (Padrão)	32,83	647,53	3,60

Os dados contidos na tabela 6 revelam uma disparidade entre os parâmetros avaliados em cultura submersa, quais sejam, Unidade Específica (Uesp) e Unidade Total (Utotal), pois os melhores valores encontrados por um parâmetro não necessariamente indicam as mesmas linhagens com os melhores valores apontadas pelo outro. No entanto, avaliando-se esta tabela

de forma global, verifica-se que os maiores valores obtidos pelas linhagens selvagens, através do cálculo da Unidade específica (Uesp), quando comparado com a linhagem padrão FP/107, estariam dentre aquelas indicadas como superiores à linhagem referência quanto a atividade enzimática total no caldo fermentado dado pelo parâmetro (U_{total}), podendo como isto denotar algum tipo de correlação.

Assim, para continuidade dos estudos deste trabalho utilizou-se todas as linhagens que apresentaram valores de atividade específica (Uesp) maiores que o obtido pela linhagem referência FP/107, que foi de 647,53 Uesp (tabela 6).

Dessa forma, segundo este critério, as linhagens mais promissoras foram: FP/21; FP/69; FP/76; FP/83; FP/39; FP/42; FP/53; FP/46, com valores de Uesp de 1833,52; 1591,04; 1482,45; 1259,83; 1156,37; 1129,71; 958,07; 861,75; respectivamente. Estas linhagens foram submetidas a ensaios cinéticos de crescimento e avaliação da atividade enzimática em três repetições. Tais resultados serão discutidos a seguir no item 4.3.

Em paralelo, por ser considerado de extrema importância, foi realizado um estudo de correlação entre os parâmetros avaliados em meio sólido e líquido, no sentido de se obter indícios mais claros, de qual ou quais seriam os critérios ou índices para se fazer uma seleção; já que nas duas condições (meio sólido e líquido), os resultados obtidos pelos parâmetros de seleção utilizados foram contraditórios, gerando certa dúvida na escolha de um deles para seleção das linhagens.

Entretanto, embora tenha sido feita a escolha das linhagens selvagens promissoras através da Uesp, os dados obtidos pelas 31 linhagens na seleção submersa foram correlacionados com os resultados observados para estas mesmas linhagens na primeira seleção (meio sólido). Tais dados foram analisados utilizando-se o coeficiente de correlação simples.

Os resultados obtidos através desta análise constam da tabela 7. Nesta, observa-se que as correlações entre os caracteres avaliados em meio sólido e aqueles avaliados em meio líquido foram pequenas, apesar de algumas serem significativas a 5% de probabilidade, como por exemplo no caso da variável E (massa seca final), que estabelece correlação entre a maioria dos caracteres avaliados com diferentes níveis de significância.

Percebe-se também que a variável D (Uesp), não apresenta correlações significativas com as demais variáveis, ou estas são negativas, portanto cuidados adicionais devem ser tomados quando tal variável for utilizada como parâmetro de seleção.

Observa-se ainda que dentro da seleção em meio sólido a correlação foi baixa para as variáveis A (IRE) e B (ADE), embora tenham sido significativas a nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7: Coeficiente de correlação simples entre pares de dados, utilizando as variáveis envolvidas na seleção em meio de cultura sólido (A e B) e em cultura submersa (C, D e E).

Variáveis	A	B	C	D	E
A	-	0,32*	0,12 ^{ns}	0,022 ^{ns}	- 0,06 ^{ns}
B	-	-	0,26 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	0,35*
C	-	-	-	0,29 ^{ns}	0,60***
D	-	-	-	-	-0,42**
E	-	-	-	-	-

Variáveis: A = Índice de Relação Enzimática; B = Área de Degradação Enzimática; C = Unidade total; D = Unidade específica; E = Massa seca final.

* = significativo a 5%, ** = significativo a 1%, *** = significativo a 0,1%; ns = não significativo

Entretanto, a seleção em meio sólido só se justificaria se o produto da herdabilidade da característica sob seleção pela correlação entre esta e a característica de interesse, aquela obtida em meio líquido, fosse superior à herdabilidade desta última. No meio líquido, não obstante, foram avaliadas duas importantes características (Atividade enzimática total - UTotal e Massa celular seca - MS) e, a partir destas, foram obtidos alguns índices de seleção baseadas na combinação destas: um deles, denominado IU_{ts}, é o produto das duas características; o outro, denominado IC, foi obtido pelo método clássico de SMITH (1936); e, por último, um índice denominado de IH¹ onde os coeficientes que multiplicam as duas características são os inversos de suas respectivas herdabilidades.

¹ Índice proposto por SOUZA JR., C. L. - ESALQ/USP (não publicado). Comunicação pessoal a FERNANDES, J. S. C. - UFPR (1994).

As características avaliadas em meio sólido foram então correlacionadas com os obtidos em meio líquido e com os índices resultantes de combinações entre estas.

Os resultados obtidos constam da Tabela 8. Nesta, observa-se que para os índices de seleção e os critérios de avaliação aplicados em meio sólido as correlações não foram significativas para a variável (a), e para a variável (b) verifica-se uma baixa correlação para os índices IH e IUTMS, apontando valores idênticos (0,35*), significativos a 5% de probabilidade, bem como valores não significativos para o índice clássico (IC).

Verifica-se também pela Tabela 8, uma correlação bastante alta entre os índices e os critérios de seleção utilizados em meio líquido (C e D), tendo sido obtido para a variável C valores superiores a 0,80*** para os índices IH e IUTMS, e 0,94*** para IC, ambos significativos a 0,1%. Para a variável D foram obtidos valores superiores a 0,90***, significativos a 0,1% apenas para os índices IH e IUTMS, enquanto que para IC a correlação obtida não foi significativa. Estes resultados sugerem que provavelmente a variável mais indicada como critério de seleção em meio líquido seria a C, que representa U_{total} , por apresentar uma alta correlação entre os critérios e índices de seleção.

Ainda pela Tabela 8, observa-se que o produto da herdabilidade dos índices IC, IH e IUTMS (valores entre parênteses) pelas suas correlações com qualquer parâmetro avaliado em meio sólido (variáveis A e B) e em meio líquido (variáveis C e D), apresentam resultados que corroboram com o exposto acima, no sentido de destacar novamente o parâmetro U_{total} (C), variável medida em meio líquido, e apontar IC como o melhor índice para seleção de linhagens. Pode-se ainda inferir que se a escolha de linhagens for feita a partir da variável C indiretamente, esta escolha não seria diferente daquela indicada por IC, já que a correlação entre estes critérios é bastante alta e o produto de sua herdabilidade também.

Cabe salientar que, embora a primeira seleção das linhagens fúngicas em cultura submersa não tenha sido feita através do melhor índice ou parâmetro indicado no estudo de correlação, tal análise foi importante para que em futuros trabalhos melhores critérios para seleção possam ser aplicados.

Tabela 8: Coeficiente de correlação simples entre pares de dados aplicados para os Índices: IC, IH e IUTMS e para os parâmetros de avaliação na seleção em meio sólido (A e B) e em meio líquido (C e D).

Variáveis e (h^2a)	Índices e (h^2a)		
	IC ($h^2a = 0,63$)	IH ($h^2a = 0,58$)	IUTMS ($h^2a = 0,44$)
A ($h^2a = 0,97$)	0,18 ^{ns} (0,11) ^P	0,003 ^{ns} (0,00) ^P	0,014 ^{ns} (0,00) ^P
B ($h^2a = 0,74$)	0,17 ^{ns} (0,10) ^P	0,35* (0,20) ^P	0,35* (0,15) ^P
C ($h^2a = 0,62$)	0,94*** (0,59) ^P	0,81*** (0,47) ^P	0,84*** (0,37) ^P
D ($h^2a = 0,50$)	0,30 ^{ns} (0,19) ^P	0,95*** (0,55) ^P	0,94*** (0,41) ^P

Variáveis: A = Índice de Relação Enzimática (IRE); B = Área de Degradação Enzimática (ADE); C = Unidade enzimática total (Utotal); D = Massa celular seca (MS).

Índices: IC = Índice clássico de SMITH (1936); IH = Índice relacionado às herdabilidades; IUTMS = Índice do produto das variáveis (C e D).

h^2a = Herdabilidade no sentido amplo.

* = significativo a 5%; *** = significativo a 0,1%; ns = não significativo.

()^P = estes valores representam o produto das herdabilidades dos índices de seleção pela correlação destes com os parâmetros avaliados em meio sólido e líquido.

4.3. Cinética de crescimento com avaliação da atividade enzimática das linhagens selecionadas

Como mencionado no item 4.2.2, as linhagens foram selecionadas em meio líquido, tomando-se aquelas que expressaram Uesp maiores que o obtido pela linhagem referência FP/107. Isto foi feito antes do conhecimento dos resultados do estudo de correlação. Na ocasião tal critério foi adotado por ser considerado adequado para seleção em cultura submersa. Dessa forma, as linhagens assim selecionadas, quais sejam, FP/21, FP/39, FP/42, FP/46, FP/53, FP/69, FP/76, FP/83, foram submetidas à fermentação submersa para avaliação de sua cinética de crescimento, bem como a avaliação da atividade enzimática.

Dentre as linhagens fúngicas selecionadas, somente as linhagens FP/39 e FP/53, não deram prosseguimento nos ensaios cinéticos, pois tais linhagens perderam a capacidade de esporulação durante os repiques, tendo sido descartadas posteriormente. Com as demais linhagens tais ensaios foram realizados com três repetições (para cada linhagem).

Embora a seleção inicial não tenha sido realizado através do Índice ou parâmetro mais indicado à seleção, os resultados obtidos nestes ensaios cinéticos, bem como nos ensaios posteriores, foram avaliados segundo o melhor critério no estudo de correlação, ou seja, utilizou-se como critério de seleção a variável U_{total} por possuir alta correlação com melhor Índice de seleção (IC) 0,94*** significativo a 0,1%.

Os resultados obtidos nos ensaios podem ser observados na Tabela 9. Nesta, pode-se constatar o desenvolvimento de cada linhagem durante um período de cinco dias, verificando-se uma grande dispersão nas atividades de cada uma das linhagens em cada um dos tempos de fermentação, já que, de modo geral, estas apresentavam valores de desvio padrão relativamente altos. Observa-se também que os valores da U_{total} no tempo de 72 horas de fermentação de cada linhagem não reproduziram os resultados encontrados na seleção em meio líquido (Tabela 6), exceção feita para as linhagens FP/21, 76 e 107, cujos valores alcançados na cinética se aproximaram aos obtidos na seleção em cultura submersa.

Tais distorções podem ser atribuídas tanto a erros inerentes a técnica como, falta de repetição da seleção em cultura submersa, ou por problemas não computados relacionados a fatores ambientais, assim como a própria variabilidade entre as espécies estudadas.

Os resultados obtidos e sumarizados na Tabela 9 foram submetidos a uma análise de variância utilizando-se um delineamento inteiramente casualizado, onde se analisou as características observadas para crescimento, através dos dados de massa celular seca (MS), e para atividade enzimática por meio da medida dada em unidade total enzimática (Utotal).

As Tabelas 10 e 11; 12 e 13, apresentam respectivamente o quadro da análise de variância bem como o teste de Tukey para as médias de cada caráter utilizado na avaliação desse experimento.

A análise de variância para os valores médios de MS (Tabela 10) apresentam valores de F significativos ao nível de 5% de probabilidade, enquanto os resultados do teste de Tukey evidenciaram diferenças consideráveis para o parâmetro avaliado (Tabela 11).

Verificou-se também que, entre as linhagens selecionadas (Tabela 9), a que apresentou a maior atividade pectinolítica foi a FP/83, expressando uma atividade total de 267,75 (Utotal) no tempo de 120 horas, representando 2,4 vezes mais do que a atividade produzida pela linhagem controle, FP/107. Pela Figura 8, verifica-se claramente a superioridade da linhagem FP/83, frente a FP/107 (padrão), bem como entre alguns dos selvagens selecionados como mais promissores. Neste caso, a análise de variância e o teste de Tukey realizado para os valores médios de Utotal (tabelas 12 e 13) corroboram essa exposição, pois é possível verificar a linhagem FP/83 diferindo das demais ao nível de significância indicado.

As linhagens selecionadas em cultura submersa foram posteriormente classificadas taxonômica e citologicamente. Tais linhagens também foram mantidas no Banco de Linhagens do Agrupamento de Biotecnologia da Divisão de Química do Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. - IPT, em dois métodos de preservação, ou seja, liofilização e criopreservação.

A linhagem FP/83, que apresentou os melhores resultados nas condições testadas, demonstrando ser bastante promissora na produção de

pectinases, também foi submetida a irradiação de luz ultravioleta, na tentativa de serem encontrados mutantes morfológicos com a capacidade de produção enzimática aumentada.

TABELA 9: Dados da cinética de crescimento com avaliação da produção enzimática dos isolados selvagens selecionados. Os valores representam a média de três experimentos independentes e seu desvio padrão.

Linhagem	Tempo de Fermentação (horas)	U Total (U x 50 ml)		Massa Seca (mg)		pH final
FP/21	24	26,00	5,63	26,07	7,85	3,56
	48	48,60	13,84	40,87	9,10	3,48
	72	60,75	17,86	45,97	6,81	3,71
	96	69,58	13,29	65,23	8,42	3,73
	120	58,08	16,79	77,30	11,00	3,76
FP/42	24	5,25	6,36	52,90	1,27	3,35
	48	12,87	2,30	43,70	14,99	3,70
	72	20,87	4,77	63,45	4,74	4,17
	96	26,75	13,79	66,20	19,52	3,81
	120	37,00	20,15	67,45	29,34	4,22
FP/46	24	13,29	0,56	42,08	12,12	3,69
	48	19,25	9,00	57,50	9,00	3,55
	72	75,53	10,49	75,53	10,49	4,06
	96	87,87	9,13	87,87	9,13	4,10
	120	43,01	10,89	101,23	12,85	4,25
FP/69	24	21,83	3,26	10,93	3,85	3,52
	48	27,42	1,66	24,20	9,82	3,54
	72	50,33	2,75	51,87	1,27	3,67
	96	71,57	24,80	74,97	12,70	3,35
	120	75,42	17,00	75,90	10,43	3,34
FP/76	24	20,14	5,83	29,35	5,44	3,55
	48	24,06	6,83	59,15	1,77	3,60
	72	42,71	24,49	68,00	5,09	3,87
	96	28,01	8,47	69,45	17,04	3,89
	120	30,56	8,63	81,65	20,29	3,98
FP/83	24	27,75	3,54	42,40	10,04	3,65
	48	99,37	20,68	60,30	17,54	3,61
	72	127,00	18,38	53,65	8,84	3,71
	96	177,53	29,16	64,77	2,04	3,89
	120	267,75	43,09	68,73	18,58	4,06

continua ...

continuação da tabela 9

Linhagem	Tempo de Fermentação (horas)	U Total (U x 50 ml)		Massa Seca (mg)		pH final
FP/107 (padrão)	24	5,22	5,07	39,23	6,51	3,61
	48	22,36	7,84	62,75	3,32	3,85
	72	38,46	21,06	79,43	15,46	3,84
	96	64,34	12,58	92,27	3,71	3,97
	120	113,16	9,23	92,93	18,90	4,18

Figura 8: Cinética de crescimento com avaliação da atividade enzimática dos isolados selvagens selecionados.

Tabela 10: Análise de variância da massa celular seca (mg) obtida pelas linhagens selvagens selecionadas FP/21, FP/42, FP/46, FP/69, FP/76, FP/83 e pela linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Valor F	Prob. > F
Linhagem	6	7202.4147608	7.8638	0.00008
Tempo de fermentação (TF)	4	22192.6167476	36.3457	0.00001
Linhagem x TF	24	3487.6155148	0.9520	0.54231
Resíduo	35	5342.7302174	-	-
Total	69	38225.3772406	-	-
Média geral = 58.639713		Coeficiente de variação = 21.07%		

Tabela 11: Teste de Tukey para os valores médios da massa celular seca (mg) obtidos pelas linhagens selvagens selecionadas FP/21, FP/42, FP/46, FP/69, FP/76, FP/83 e pela linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados.

Número de Ordem	Número de Tratamento	Nome	Número de repetição	Médias	Médias originais	5%
1	7	FP/107	10	72.670000	72.670000	a
2	3	FP/46	10	71.939999	71.939999	a
3	5	FP/76	10	61.540000	61.540000	ab
4	6	FP/83	10	57.860000	57.860000	abc
5	1	FP/21	10	53.530000	53.530000	bc
6	2	FP/42	10	49.217998	49.217998	bc
7	4	FP/69	10	43.720001	43.720001	c

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

D.M.S. 5% = 17.28864

Tabela 12: Análise da variância da Unidade enzimática total (Utotal) obtido pelas linhagens selvagens selecionadas FP/21, FP/42, FP/46, FP/69, FP/76, FP/83 e pela linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Valor F	Prob. > F
Linhagem	6	91707.0369681	29.5480	0.00001
Tempo de fermentação (TF)	4	46409.1486033	22.4295	0.00001
Linhagem x TF	24	49378.9874950	3.9775	0.00023
Resíduo	35	18104.7192097	-	-
Total	69	205599.892276	-	-
Média geral = 54.700428		Coeficiente de variação = 41.57%		

Tabela 13: Teste de Tukey para os valores médios do parâmetro Utotal obtido pelas linhagens selvagens selecionadas FP/21, FP/42, FP/46, FP/69, FP/76, FP/83 e pela linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados.

Número de Ordem	Número de Tratamento	Nome	Número de repetição	Médias	Médias originais	5%
1	6	FP/83	10	134.700000	134.700000	a
2	1	FP/21	10	67.775000	67.775000	b
3	7	FP/107	10	57.135000	57.135000	bc
4	4	FP/69	10	44.975000	44.975000	bcd
5	5	FP/76	10	29.095000	29.095000	cd
6	3	FP/46	10	28.673000	28.673000	cd
7	2	FP/42	10	20.550000	20.550000	d

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

D.M.S. 5% = 31.82549

4.4 Caracterização das linhagens selecionadas

4.4.1. Classificação das linhagens

As linhagens foram classificadas na Universidade Federal de Pernambuco, de acordo com o item (3.10.1.) da metodologia. Tais linhagens encontram-se abaixo relacionadas (Tabela 14).

Tabela 14: Classificação taxonômica dos isolados selvagens selecionados.

Nº das Linhagens	Classificação
FP/21	<i>Penicillium wasksmani</i> Zaleski
FP/42	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem
FP/46	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem
FP/69	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem
FP/76	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem
FP/83	<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai

Todos os gêneros encontrados, descritos acima, têm sido relatados como produtores de pectinase (PARK, 1972; FOGARTY & KELLY, 1983). Entretanto, o gênero *Aspergillus* tem sido o mais utilizado para preparações de enzimas pécticas industriais, provavelmente por possuir aprovação para uso na indústria de alimentos.

4.4.2. Caracterização citológica das linhagens

As linhagens foram caracterizadas citologicamente pela técnica de coloração de núcleos, estimando o número de núcleos por esporos (item 3.10.2). Foram analisados 500 conídios por linhagem, cujos resultados encontram-se sumarizados na Tabela 15. Nesta, observa-se que somente as linhagens FP/21 e FP/83, apresentaram conídios 100% uninucleados. A obtenção de linhagens com esporos uninucleados constitui-se de um material propício para futuros estudos genéticos, uma vez que a obtenção e seleção de mutantes é facilitada a partir de conídios uninucleados (PONTECORVO *et. al.*, 1953).

Tabela 15: Frequência de núcleos por conídios das linhagens selvagens selecionadas.

Linhagem	% de núcleos por conídios					
	Uni	Bi	Tri	Tetra	Penta	Multinucleados
FP/21	100,0					
FP/42	42,6	57,4				
FP/46	67,4	32,6				
FP/69	78,2	19,2	1,2	1,4		
FP/76	54,2	44,0	1,2	0,6		
FP/83	100,0					
FP/107		4,0	23,2	37,0	25,0	9,6

Através das Figuras 9 e 10, apresentadas a seguir, podem ser observadas as características morfológicas apresentadas pelos conídios de cada uma das linhagens selvagens selecionadas.

Figura 9 - Linhagem FP/21 - conídios ovais uninucleados, normalmente em forma de correntes e núcleos bem acentuados (a); Linhagem FP/42 - conídios redondos de parede ornamentada, uni e binucleados (b); Linhagem FP/46 - conídios redondos, uni e binucleados (c); Linhagem FP/69 - conídios redondos irregulares, uni e binucleados (d). Aumento de 1.500x.

Figura 10 - Linhagem FP/76 - conídios redondos, uni e binucleados (a); Linhagem FP/83 - conídios ovais uninucleados, núcleos acentuados, (b); Linhagem FP/107 - conídios grandes multinuclear arredondados, e de parede levemente ornamentada, (c); Aumento de 1500x.

4.5. Determinação da redução de colônia pelo emprego de desoxicolato de sódio

A linhagem selecionada como mais promissora quanto à produção de pectinases foi classificada como *Trichoderma harzianum* Rifai (FP/83), possui um rápido crescimento, que é característico para esse gênero (BISSETT, 1984). Fez-se necessária a determinação da concentração adequada de desoxicolato de sódio para que, com a redução no tamanho da colônia, fosse possível observar um maior número de colônias em sua forma individualizada em uma única placa, facilitando assim o acompanhamento da sobrevivência dos conídios, quando expostos à luz ultravioleta.

A Tabela 16 mostra a redução do diâmetro das colônias por desoxicolato de sódio, em meio completo, ao longo do tempo e em função da concentração empregada para desoxicolato de sódio. Nesta Tabela observa-se que o crescimento reduziu-se consideravelmente na presença do desoxicolato de sódio, sendo o efeito da inibição diretamente proporcional à concentração usada. Em concentrações entre 0,1% e 0,2%, obteve-se redução suficiente para individualização de colônias, selecionando-se a concentração de 0,1% desta solução redutora a continuidade dos trabalhos.

Tabela 16: Redução do diâmetro de colônias de *Trichoderma harzianum* Rifai, crescidas em meio completo (os dados constituem média de três repetições, e estão expressos em cm).

Concentração (%)	TEMPO (HORAS)				
	24	48	72	96	120
0,0	2,50	3,40	5,00	7,70	9,00
0,1	0,45	0,58	1,00	1,60	1,97
0,2	0,37	0,50	0,80	1,27	1,53
0,3	-	0,30	0,52	0,93	1,00

O desoxicolato de sódio têm sido utilizado com sucesso na obtenção de colônias isoladas de espécies do gênero *Trichoderma* (SCHIMENTI *et al.*, 1983; ZALDIVAR *et al.*; 1987 e CARVALHO (1989), e de

outros fungos filamentosos (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1977). CARVALHO, 1989, analisou o efeito de desoxicolato de sódio sobre o diâmetro das colônias e observou o desenvolvimento micelial e conidiação em *Trichoderma reesei* QM 9414 e *Trichoderma sp.*, determinando neste caso a utilização de 0,5% de redutor em todos os ensaios. Constatou ainda, que esta substância redutora atua a nível de metabolismo primário retardando o desenvolvimento de hifas e a formação de conídios. Na presença do redutor, observou também a ocorrência de clamidosporos, em *Trichoderma sp.*, após 72 horas de incubação.

Comparativamente, aos resultados de CARVALHO (1989), a linhagem *T. harzianum* Rifai FP/83 isolada neste trabalho, mostrou-se mais sensível ao efeito redutor do desoxicolato de sódio, reduzindo o tamanho da colônia a cerca de 10 vezes em relação ao controle quando 0,3% desse redutor foi utilizado. Estes resultados demonstram que, embora o modo de ação deste redutor possa ser semelhante em ambos os casos, as particularidades e sensibilidade de cada linhagem devem ser investigadas, para se evitar o uso de concentrações inadequadas e possivelmente deletérias do mesmo.

4.6. Sobrevivência à luz ultravioleta

A linhagem selecionada FP/83 (*Trichoderma harzianum* Rifai) não pertence ao gênero mais aceito na produção de pectinases para utilização na indústria de alimentos, entretanto foi verificado que tal linhagem não é produtora de aflatoxinas. O teste foi realizado pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, no Departamento de Microbiologia, Seção de Micologia, segundo o método descrito por LIN & DIANASE (1970). Este resultado foi importante, pois, de certo modo, tranqüiliza as posteriores manipulações com tal linhagem.

A linhagem selecionada foi avaliada quanto à sua sobrevivência ao mutagênico luz ultravioleta, estabelecendo-se uma curva de sobrevivência para a obtenção de mutantes visando futuros estudos genéticos. A luz ultravioleta tem sido utilizada com sucesso na obtenção de mutantes de espécies do gênero *Trichoderma* (TOYAMA *et al.*, 1984; KAWAMORI *et al.*, 1985; CARVALHO, 1989).

Suspensões de conídios de *Trichoderma harzianum* Rifai (FP/83) foram irradiados com luz ultravioleta, de acordo com o item (3.9.5.). A Tabela 17 e Figura 11 mostram os dados referentes à porcentagem e curva de sobrevivência, respectivamente. A porcentagem de sobrevivência em torno de 5% foi obtida aos 4 minutos e 45 segundos de tratamento. A linhagem apresentou grande susceptibilidade à luz ultravioleta, evidenciada pela redução acentuada de células viáveis/ml no decorrer do tratamento.

Tabela 17: Porcentagem de sobrevivência dos conídios de *Trichoderma harzianum* Rifai após exposição à luz ultravioleta (os dados constituem média de três repetições).

Tempo (minutos)	Conídios viáveis/ml	% relativa de sobrevivência
0	$2,20 \times 10^6$	100
T2	$1,85 \times 10^6$	84.09
T3	$1,20 \times 10^5$	54.55
T4	$4,30 \times 10^5$	19.55
T5	$3,75 \times 10^5$	1.70
T6	$2,33 \times 10^4$	1.06

Figura 11 - Curva de sobrevivência dos conídios da linhagem de *Trichoderma harzianum* Rifai (FP/83) após exposição à luz ultravioleta.

Segundo AZEVEDO (1985), a resposta a um tratamento mutagênico se deve principalmente ao grau de pigmentação, ao número de núcleos por conídio e quantidade de DNA existente no material genético. GOLDMAN (1988) relatou para *A. niger* uma resistência à exposição de luz ultravioleta relacionada com a presença de conídios com pigmentação escura. O tempo de tratamento para obtenção de 5% de sobrevivência de conídios da linhagem de *T. harzianum* Rifai (FP/83), foi bem inferior àquele obtido para *Humicola* sp (RODRIGUES, 1987) e *Aspergillus niger* (GOLDMAN, 1988), mas superior em relação a outros fungos como *Aspergillus* sp. (PEREIRA, 1978), *Metarhizium anisopliae* (BAGALHI, 1987) e *Boveria bassianica* (PACCOLA-MEIRELLES, 1988). Embora a linhagem de *Trichoderma harzianum* Rifai apresente conídios pigmentados (RIFAI, 1969), o que dificultaria a penetração da luz ultravioleta, estes são uninucleados, o que poderia explicar valores intermediários de tratamento, em relação a outros fungos. Entretanto, esta hipótese não pode se considerada isoladamente, pois apesar do tempo de exposição ser um dado importante, torna-se incompleto quando este não esta associado a potência (nível de energia) da luz de ultravioleta que foi utilizada.

4.6.1. Obtenção de mutantes morfológicos

Após a curva de sobrevivência, foram isolados os mutantes morfológicos encontrados no tempo de 4 minutos e 45 segundos, conforme indicado no item (3.9.5.). Na Tabela 18 encontram-se sumarizados os 20 mutantes obtidos entre as 250 colônias analisadas, bem como suas respectivas características, observando-se sete mutantes de coloração branca, três de coloração marron, um de coloração amarela e nove de coloração verde com morfologia alterada em relação a seu parental.

Tabela 18: Mutantes morfológicos resultantes do tratamento de conídios da linhagem *Trichoderma harzianum* Rifai (FP/83), com luz ultravioleta, no tempo de exposição de 4 minutos e 45 segundos.

Número de Mutantes Morfológicos	Características Morfológicas
1 (1/4)	colônia verde compactada
2 (1/8)	colônia branca
3 (1/9)	colônia branca
4 (1/14)	colônia branca
5 (1/15)	colônia branca
6 (1/19)	colônia branca
7 (2/3)	colônia marrom
8 (2/19)	colônia branca
9 (2/25)	colônia marrom
10 (4/8)	colônia verde compactada
11 (5/19)	colônia verde compactada
12 (6/1)	colônia branca
13 (6/17)	colônia verde compactada
14 (7/2)	colônia verde compactada
15 (7/7)	colônia marrom
16 (7/13)	colônia amarela
17 (7/14)	colônia verde compactada
18 (8/14)	colônia verde compactada
19 (10/7)	colônia verde compactada
20 (10/9)	colônia verde alterada c/redução de conidiação
FP / 83 (parental)	colônia verde

4.7. Seleção dos mutantes em cultura submersa

Após a mutagênese, todos os mutantes encontrados (20 variantes morfológicos) passaram pela seleção em cultura submersa conforme item (3.7), por ter sido indicado inicialmente como método muito eficaz, embora mais demorado, na seleção de linhagens promissoras na produção desse complexo enzimático, nas condições testadas.

Pela análise dos resultados (tabela 19), nota-se que 14 variantes morfológicas representando 70% do total dos mutantes isolados apresentaram valores de atividade total em torno de 2 a 2,5 vezes maior que seu parental. Cerca de 10% dos variantes morfológicos avaliados mantiveram sua produção enzimática a níveis parecidos e 20% produziram bem menos.

Além disso, observa-se ainda pela Tabela 19 que houve uma grande homogeneidade nos níveis de pH final obtidos para as linhagens mutantes testadas. O mesmo não foi observado durante a seleção dos isolados selvagens (Tabela 6), o que talvez seja explicado devido a grande variabilidade existente entre esses isolados. A manutenção do pH a níveis baixos e próximos dos valores a que foram tamponados (pH = 3.5), é bastante interessante pois tal faixa de pH tem sido indicada com excelente para a biossíntese das enzimas pectinolíticas (FUMIAN, 1987).

Por outro lado, o desenvolvimento celular acompanhado pela medida de massa seca não apresentou a mesma homogeneidade observada para medida de pH final. Na Tabela 19 observa-se que cerca de 50% dos mutantes tiveram um desenvolvimento celular inferior ao que foi obtido pela linhagem parental (FP/83). Entretanto este dado parece não estar refletindo diretamente na capacidade secretora desses mutantes, pois uma linhagem mutante como por exemplo a 10/7, com valor de biomassa inferior a seu parental, foi capaz de secretar níveis enzimáticos ligeiramente superior a este.

Tais resultados talvez sejam explicados devido a possíveis alterações na parede celular desses variantes provocadas quando os conídios de origem foram expostos à luz ultravioleta, possibilitando assim uma maior facilidade na secreção de enzimas. Esta hipótese tem sido levantada por diferentes autores. GRATZNER (1972) descreveu um mutante de *Neurospora crassa*, com alterações na parede celular associadas com hiperprodução de enzimas extracelulares. MORAYAMA & TSHIKAWA (1973) obtiveram mutantes com alterações simultâneas de atividades exoenzimáticas e de crescimento.

A partir desta seleção, apesar de muitos variantes morfológicos terem se sobressaído ao seu parental quanto à capacidade aumentada na produção do complexo enzimático em foco neste trabalho, foram escolhidos apenas 5 mutantes morfológicos para que as cinéticas enzimáticas comparativas com o parental fossem realizadas. Tais linhagens exibiram os maiores valores de U_{total} comparados a linhagem parental FP/83, que foi de 140,00 U_{total} ; sendo estas: 1/4, 1/9, 2/3, 5/19 e 6/1, com valores de U_{total} de 297,13; 310,00; 202,38; 205,02 e 213,60, respectivamente.

Tabela 19: Seleção em cultura submersa dos mutantes morfológicos provenientes da linhagem de *Trichoderma harzianum* Rifai FP/83 (medidas de atividade enzimática no tempo 72 horas)

Linhagem	U / ml	U / total	Uesp.	M.seca (mg)	pH Final
		U x 50ml	(U total / mg M. seca)		
1/4	5.54	297.13	5.714.04	52,00	3.58
1/8	2.74	136.84	3.138.53	43,60	3.47
1/9	6.20	310.00	4.783.95	64,80	3.62
1/14	3.98	198.97	3.153.25	63,10	3.56
1/15	3.53	176.46	3.095.79	57,00	3.48
1/19	2.83	141.39	2.827.80	50,00	3.52
2/3	4.05	202.38	3.172.10	63,80	3.44
2/19	3.24	161.80	2.889.29	56,00	3.45
2/25	3.25	161.55	2.802.59	58,00	3.50
4/8	1.88	95.00	1.413.53	66,50	3.51
5/19	4.10	205.02	2.642.01	77,60	3.72
6/1	4.27	213.60	3.064.53	63,70	3.54
6/17	2.64	132.14	1.512.30	69,10	3.48
7/2	3.01	150.74	2.233.18	67,50	3.70
7/7	3.10	154.98	2.685.56	57,70	3.5
7/13	1.05	54.72	1.169.23	46,80	3.58
7/14	3.11	155.65	2.048.03	76,00	3.49
8/14	1.03	51.67	1.048.07	49,30	3.63
10/7	3.33	166.55	4.237.91	39,30	3.56
10/9	1.09	54.35	1.489.04	36,50	3.54
FP/83	2.80	140.00	2.337.23	59,90	3.46

4.8. Cinética de crescimento com avaliação da atividade enzimática dos mutantes selecionados

Foram selecionados 5 mutantes morfológicos: 1/4, 1/9, 2/3, 5/19 e 6/1, para realização das cinéticas. Entretanto, apenas 4 desenvolveram-se adequadamente para condução do referido ensaio: 1/4, 1/9, 2/3 e 6/1, a linhagem mutante 5/19 não se desenvolveu satisfatoriamente, tendo sido descartada posteriormente. Conduziu-se a fermentação de modo semelhante ao apontado no item (3.8).

A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos. A dispersão entre os valores de atividades foi a mesma que aquela encontrada na cinética dos selvagens mais promissores. Novamente verificaram-se valores extremamente altos de desvio padrão para as medidas de atividade enzimática (U_{total}), principalmente para os mutantes após o tempo de 72 horas de fermentação, sendo que a linhagem parental *Trichoderma harzianum* Rifai (FP/83) foi a que apresentou a menor dispersão. Talvez esta apresente maior estabilidade frente a seus mutantes, sofrendo menor alteração com as possíveis mudanças ambientais. Nota-se também na Tabela 20, que os valores de biomassa parecem semelhantes para os mutantes 1/9; 2/3 e 6/1 e apresentam uma dispersão maior que seu parental FP/83. O mutante 1/4 apresenta níveis de biomassa e dispersão em geral mais baixos que os demais mutantes. Verifica-se também que, de modo geral, a máxima produção de biomassa coincide com a máxima atividade enzimática.

Tais resultados diferem daqueles apresentados por ANGELOVA (1986) que, estudando a produção de enzimas pectinolíticas em cultura submersa por *Aspergillus niger*, observou que o valor máximo de acúmulo de biomassa não coincide com a máxima de biossíntese de polimetilgalacturonase. O mais alto acúmulo de biomassa foi observado a 32 horas enquanto o máximo de formação de enzima ocorreu a 72 horas. Segundo o autor, estes resultados podem indicar uma síntese residual em polimetilgalacturonase, que pode ser devida a alta estabilidade do RNA desta enzima. Esta estabilidade foi confirmada por experimentos com actinomicina D. A enzima continuou a ser formada mesmo depois da transcrição bloqueada.

TABELA 20: Dados da cinética de crescimento com avaliação da atividade pectinolítica dos mutantes morfológicos selecionados, comparados ao parental FP/83. Os valores representam a média de três experimentos independentes e seu desvio padrão.

Linhagem	Tempo de Fermentação (h)	U / ml	U total U / 50 ml	Massa seca (mg)	pH
1/4	24	0.11 ± 0.08	5.72 ± 4.18	30.17 ± 8.35	3.65
	48	2.07 ± 0.23	103.73 ± 1.45	45.30 ± 9.87	3.59
	72	5.11 ± 2.38	255.47 ± 18.96	51.03 ± 5.55	3.64
	96	7.47 ± 2.61	573.37 ± 130.39	57.43 ± 9.43	3.73
	120	8.10 ± 2.17	405.09 ± 108.68	57.50 ± 2.43	3.86
1/9	24	0.30 ± 0.32	15.24 ± 16.10	34.73 ± 11.64	3.82
	48	1.48 ± 0.38	73.82 ± 19.13	44.30 ± 11.55	3.62
	72	1.70 ± 1.02	146.23 ± 50.83	53.33 ± 11.55	3.72
	96	3.89 ± 1.25	194.46 ± 62.73	64.73 ± 12.95	3.85
	120	5.79 ± 2.82	284.33 ± 141.22	65.90 ± 8.88	4.12
2/3	24	0.22 ± 0.25	11.10 ± 12.63	31.73 ± 11.64	3.72
	48	1.35 ± 0.71	67.61 ± 35.55	44.30 ± 11.55	3.57
	72	2.36 ± 1.13	117.90 ± 56.68	53.33 ± 11.55	3.64
	96	3.47 ± 1.96	173.45 ± 98.09	64.73 ± 12.95	3.73
	120	4.27 ± 2.81	213.51 ± 140.61	65.90 ± 8.88	3.93
6/1	24	0.19 ± 0.11	9.72 ± 5.72	32.53 ± 10.34	3.80
	48	1.21 ± 0.57	60.30 ± 28.61	48.83 ± 16.57	3.58
	72	2.01 ± 0.68	100.70 ± 34.10	55.20 ± 8.91	3.63
	96	3.09 ± 1.29	154.62 ± 64.56	62.93 ± 14.89	3.76
	120	4.54 ± 3.02	226.81 ± 150.90	67.10 ± 5.66	3.84
FP/83 (Parental)	24	0.21 ± 0.16	10.64 ± 7.98	30.00 ± 3.82	3.60
	48	1.82 ± 0.11	91.00 ± 5.66	46.90 ± 1.77	3.59
	72	3.00 ± 0.28	150.00 ± 14.14	53.50 ± 8.70	3.64
	96	4.01 ± 0.30	200.50 ± 14.85	59.00 ± 6.86	3.77
	120	5.50 ± 0.42	274.87 ± 21.04	69.60 ± 8.56	3.80

Os valores de atividade enzimática no ensaio cinético, também não reproduziram os obtidos na seleção em cultura submersa (Tabela 19) para os mutantes 1/9, 2/3 e 6/1, a exemplo do que ocorreu durante a seleção dos isolados selvagens. Tal metodologia não está isenta de falhas, já que podem existir casos onde as linhagens apresentem atividades enzimática máximas na fase estacionária (GACESA & HUBBLE, ([198-])). Dessa forma a comparação entre linhagens, através da medida de atividade enzimática em único tempo de fermentação pode ser arriscada.

Contudo, sabe-se que, de maneira geral, a enzima é sintetizada durante parte do ciclo de crescimento, ou seja, algumas proteínas são

sintetizadas e secretadas durante a fase exponencial de crescimento (GACESA & RUBBLE ([198-])).

Portanto, supôs-se que o tempo de fermentação utilizado (72 horas), estivesse, para a maioria dos isolados, entre as fases exponencial e estacionária, já que muitos autores utilizam este tempo de fermentação para tomada de amostras e respectivas medidas enzimáticas (HUANG, 1988; FRIESE, 1987).

Pela Tabela 20, observa-se a superioridade do mutante 1/4 com atividades cerca de 2 vezes maior, após 72 horas de fermentação, que a apresentada pelo seu parental (FP/83). Nota-se ainda que, seus resultados apresentaram-se reprodutíveis frente aos valores obtidos na seleção em cultura submersa. Estes dados podem ser melhor observados pela Figura 12, pois a superioridade da linhagem mutante 1/4 é destacada tanto frente ao seu parental FP/83 quanto a linhagem padrão FP/107. Nesta verifica-se também que até o maior tempo de fermentação avaliado (120 horas), não ocorre um declínio na produção enzimática. Entretanto, a produção de massa celular observada na Tabela 20, parece indicar que a maioria das linhagens se encontram numa fase estacionária de crescimento.

Os resultados contidos na Tabela 20 foram submetidos a uma análise de variância (Tabela 21). Através desta constata-se que realmente a variável massa celular seca não apresenta diferenças significativas entre os resultados obtidos para os mutantes, o que foi comprovado pelo teste de Tukey (Tabela 22). Pela Tabela 23 observa-se que para a variável U_{total} , houve diferenças significativas entre as linhagens, pelo teste de Tukey nota-se que a diferença existe apenas entre a linhagem mutante 1/4 e as demais 1/9, 2/3 e 6/1 e a parental FP/83. Para estas últimas não se observa nenhuma diferença ao nível de significância indicado (Tabela 24).

Figura 12 - Cinéticas de crescimento com avaliação da atividade enzimática dos mutantes morfológicos selecionados, comparadas ao parental (FP/83) e a linhagem padrão (FP/107).

Tabela 21: Análise de variância da massa celular seca (mg) obtida pelas linhagens mutantes selecionadas 1/4, 1/9, 2/3, 6/1 e pela linhagem parental FP/83, nos ensaios cinéticos realizados.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Valor F	Prob. > F
Linhagem	4	1098.8089227	2.2575	0.07518
Tempo de fermentação (TF)	4	9331.6805581	19.1717	0.00001
Linhagem x TF	16	1224.6276048	0.6290	0.84506
Resíduo	50	6084.2704049	-	-
Total	74	17739.3874904	-	-
Média geral = 53.409599		Coeficiente de variação = 20.65%		

Tabela 22: Teste de Tukey para os valores médios da massa celular seca (mg) obtida pelas linhagens mutantes selecionadas 1/4, 1/9, 2/3, 6/1 e pela linhagem parental FP/83, nos ensaios cinéticos realizados.

Número de Ordem	Número de Tratamento	Nome	Número de repetição	Médias	Médias originais	5%
1	5	FP/83	15	59.380001	59.380001	a
2	3	2/3	15	54.153334	54.153334	ab
3	2	1/9	15	53.193333	53.193333	ab
4	4	6/1	15	52.980000	52.980000	ab
5	1	1/4	15	47.341332	47.341332	b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

D.M.S. 5% = 11.42136

Tabela 23: Análise de variância da Unidade enzimática total (U_{total}) obtida pelas linhagens mutantes selecionadas 1/4, 1/9, 2/3, 6/1 e pela linhagem parental FP/83, nos ensaios cinéticos realizados.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Valor F	Prob. > F
Linhagem	4	142882.6071202	8.5952	0.00009
Tempo de fermentação (TF)	4	647404.9664147	38.9452	0.00001
Linhagem x TF	16	84412.8504130	1.2695	0.25301
Resíduo	50	207793.6000415	-	-
Total	74	1082494.023989	-	-
Média geral = 147.949203		Coeficiente de variação = 43.57%		

Tabela 24: Teste de Tukey para os valores médios do parâmetro U_{total} obtido pelas linhagens mutantes selecionadas 1/4, 1/9, 2/3, 6/1 e pela linhagem parental FP/83, nos ensaios cinéticos realizados.

Número de Ordem	Número de Tratamento	Nome	Número de repetição	Médias	Médias originais	5%
1	1	1/4	15	228.617337	228.617337	a
2	5	FP/83	15	156.765328	156.765328	b
3	2	1/9	15	130.549332	130.549332	b
4	3	2/3	15	116.356670	116.356670	b
5	4	6/1	15	107.457333	107.457333	b

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

D.M.S. 5% = 66.74670

Para efeito comparativo entre as linhagens selvagens, mutantes e a linhagem referência, foi conduzida uma análise onde os parâmetros utilizados para avaliação durante a seleção em cultura submersa, assim como nos ensaios cinéticos entre as linhagens selvagens e mutantes mais promissoras, ou seja, as características de cada linhagem avaliada através de sua massa celular seca (MS) e unidade enzimática total (Utotal), foram analisados seguindo um experimento fatorial em blocos casualizados, onde as linhagens padrão (FP/107), a parental (FP/83) e seus mutantes (1/4, 1/9, 2/3 e 6/1) foram analisados juntamente com mais duas linhagens selvagens selecionadas previamente (FP/21) e (FP/69), dando um total de 8 níveis para o fator fungo. Os resultados obtidos constam das tabelas 25 e 26, 27 e 28, e 29 e 30, as quais apresentam respectivamente o quadro da análise de variância e o teste de Tukey para as médias de cada parâmetro, bem como para o índice clássico de seleção (SMITH, 1936).

Verifica-se pela análise de variância apresentadas nas Tabelas 25, 27 e 29 que houveram algumas diferenças significativas ao nível de significância de 5% de probabilidade entre as linhagens e cada um dos parâmetros avaliados MS, Utotal e IC, respectivamente. Quanto as herdabilidades de cada parâmetro, nota-se que para Utotal e IC foram obtidos os maiores valores de herdabilidade, sendo respectivamente 62% e 63%, e mais baixa para MS (50%).

Observa-se também pelo teste de Tukey que para os parâmetros Utotal e IC à semelhança dos resultados de herdabilidades, estas variáveis não diferem entre si, inclusive é lógico a ordem dos fungos. Neste caso, os resultados parecem indicar que a seleção seria realmente bastante efetiva na utilização de qualquer um desses dois parâmetros. Os dados obtidos confirmaram esta indicação, já que a linhagem 1/4 selecionada como a mais promissora pelo parâmetro apresenta os mesmos resultados quando avaliados pelo índice IC, diferindo das outras linhagens mutantes e de seu parental, bem como das linhagens selvagens FP/21 e FP/69 e linhagem padrão FP/107, ao nível de significância indicado.

Tabela 25: Análise de variância da massa celular seca (MS) obtida pelas linhagens selvagens selecionadas FP/83, FP/69, e pelos mutantes de FP/83: 1/4, 1/9, 2/3, 6/1, e linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados.

Causas da variação	G.L.	S.Q	Valor F	Prob. > F
Bloco	2	4812.7741162	32.0247	0.00001
Fungo	7	8285.3344489	15.7519	0.00001
Tempo de fermentação (TF).	4	27601.2661710	91.8309	0.00001
Fungo x TF	28	4549.4264652	2.1623	0.00435
Resíduo	78	5861.0394149	-	-
Total	119	1109.8406161	-	-

Média geral = 54.762501

Coefficiente de Variação = 15.829 %

$h_1^2 = 0,496$

Tabela 26: Teste de Tukey para as médias da massa celular seca, obtida pelas linhagens selvagens selecionadas FP/83, FP/69, e pelos mutantes de FP/83: 1/4, 1/9, 2/3, 6/1, e linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados.

Número de Ordem	Número de Tratamento	Nome	Número de repetição	Médias	Médias originais	5%
1	4	FP/107	15	74.506667	74.506667	a
2	7	FP(2/3)	15	56.820000	56.820000	b
3	3	FP/83	15	55.926666	55.926666	b
4	6	FP(1/9)	15	53.186667	53.186667	bc
5	8	FP(6/1)	15	53.180000	53.180000	bc
6	1	FP/21	15	51.626666	51.626666	bc
7	5	FP(1/4)	15	47.680000	47.680000	bc
8	2	FP/69	15	45.173333	45.173333	c

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

Tabela 27: Análise de variância da Unidade enzimática total (Utotal) obtida pelas linhagens selvagens selecionadas FP/83, FP/69, e pelos mutantes de FP/83: 1/4, 1/9, 2/3, 6/1, e linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados.

Causas da variação	G.L.	S.Q	Valor F	Prob. > F
Bloco	2	70154.3900620	16.3804	0.00002
Fungo	7	387152.7874145	25.8276	0.00001
Tempo de fermentação (TF).	4	580633.2224536	67.7862	0.00001
Fungo x TF	28	213520.2411650	3.5611	0.00003
Resíduo	78	167030.2441906	-	-
Total	119	1418490.8852857	-	-

Média geral = 111.641335

Coefficiente de Variação = 41.450%

$h_j^2 = 0,623$

Tabela 28: Teste de Tukey para médias do parâmetro Utotal, obtida pelas linhagens selvagens selecionadas FP/83, FP/69, e pelos mutantes de FP/83: 1/4, 1/9, 2/3, 6/1, e linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados.

Número de Ordem	Número de Tratamento	Nome	Número de repetição	Médias	Médias originais	5%
1	5	FP(1/4)	15	228.677334	228.677334	a
2	6	FP(1/9)	15	143.816667	143.816667	b
3	3	FP/83	15	135.216667	135.216667	b
4	7	FP(2/3)	15	116.714000	116.714000	b
5	8	FP(6/1)	15	110.429333	110.429333	bc
6	1	FP/21	15	60.616667	60.616667	cd
7	2	FP/69	15	49.313333	49.313333	d
8	4	FP/107	15	48.346667	48.346667	d

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

Tabela 29: Análise de variância para o Índice clássico de Smith (IC), obtido pelas linhagens selvagens selecionadas FP/83, FP/69, e pelos mutantes de FP/83: 1/4, 1/9, 2/3, 6/1, e linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados.

Causas da variação	G.L.	S.Q	Valor F	Prob. > F
Bloco	2	62152.7305817	14.5614	0.00004
Fungo	7	396693.2325690	26.5539	0.00001
Tempo de fermentação (TF).	4	525944.4398085	61.6100	0.00001
Fungo x TF	28	223244.1025144	3.7359	0.00002
Resíduo	78	166465.0401981	-	-
Total	119	1374499.5456718	-	-

Média geral = 99.155487

Coefficiente de Variação = 46.591%

$h_i^2 = 0,630$

Tabela 30: Teste de Tukey para médias do parâmetro de seleção (IC) obtido pelas linhagens selvagens selecionadas FP/83, FP/69, e pelos mutantes de FP/83: 1/4, 1/9, 2/3, 6/1, e linhagem padrão FP/107, nos ensaios cinéticos realizados.

Número de Ordem	Número de Tratamento	Nome	Número de repetição	Médias	Médias originais	5%
1	5	FP(1/4)	15	217.806298	217.806298	a
2	6	FP(1/9)	15	131.690106	131.690106	b
3	3	FP/83	15	122.465387	122.465387	b
4	7	FP(2/3)	15	103.759040	103.759040	b
5	8	FP(6/1)	15	98.304292	98.304292	bc
6	1	FP/21	15	48.845787	48.845787	cd
7	2	FP/69	15	39.013813	39.013813	d
8	4	FP/107	15	31.359147	31.359147	d

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado.

4.9. Teste comparativo entre a cinética do mutante mais promissor e seu parental

Diante dos resultados encontrados no ensaio de cinética enzimática entre os mutantes mais promissores, foi realizada uma nova cinética para efeito comparativo com um maior número de pontos entre a linhagem selvagem selecionada de *Trichoderma harzianum* Rifai (FP/83) e seu mutante 1/4, indicado como melhor.

Os resultados encontram-se listados na Tabela 31, e o desempenho comparativo entre as duas linhagens pode ser observado na Figura 13. Verifica-se uma queda na produção entre a 144^a e a 154^a hora, retomada com valores crescentes até a 192^a, no momento da última amostragem. Sendo assim, não foi possível verificar a fase final de produção enzimática para os fungos testados, porém, houve reprodutibilidade dos resultados, constatando mais uma vez a superioridade do mutante 1/4, frente as atividades enzimáticas obtidas pelo seu parental (FP/83). A aplicação de um segundo ciclo de mutação-seleção pode promover resultados ainda melhores.

DIANOVA *et al.* (1970) selecionaram uma linhagem entre cerca de 1.000 mutagênicas: *Etilenimina* e U.V., bem como sua combinação. Os autores verificaram que após o terceiro ciclo de mutação-seleção, a atividade pectinolítica era de 3,5 vezes melhor que na linhagem original. Os autores sugerem que pelos resultados obtidos, apenas dois ciclos de mutação-seleção seriam suficientes.

TABELA 31: Cinética comparativa entre a linhagem selvagem FP/83 e seu mutante 1/4.

Linhagens	Tempo de	U / ml	U total (U x 50 ml)	Uesp (U total / g.m. seca)	Massa	pH
	Fermentação (horas)				Seca (mg)	
1/4	0	-	0	-	0	3.55
	10	0.06	3.0	121.46	24.7	3.56
	22	0.07	3.5	98.04	35.7	3.64
	28	0.09	4.5	201.79	22.3	6.67
	34	0.54	27.0	1.134.45	23.8	3.68
	46	1.54	77.25	2.399.07	32.2	3.59
	52	2.52	126.0	3.727.81	33.8	3.62
	58	1.66	82.78	2.019.02	41.0	3.55
	70	3.93	196.70	4.400.45	44.7	3.81
	76	4.42	220.91	3.980.36	55.5	3.63
	82	5.49	274.72	7.345.45	37.4	3.65
	95	6.62	330.91	6.644.78	49.8	3.72
	100	7.03	351.36	-	9.5	3.78
	106	7.89	394.77	9.332.62	42.3	3.76
	119	7.72	385.98	8.520.53	45.3	3.86
	130	10.67	533.34	10.396.49	51.3	3.89
	142	13.16	658.23	13.112.15	50.2	4.00
	154	10.16	508.09	10.041.30	50.6	3.90
	166	11.71	585.32	10.759.56	54.4	4.01
	175	12.40	619.81	11.672.50	53.1	4.30
	197	14.71	735.55	13.521.14	54.4	4.12
FP/83	0	-	0	-	-	3.55
	10	0.08	4.23	204.35	20.7	3.55
	22	0.11	5.39	160.42	33.6	3.67
	28	0.12	6.20	268.40	23.1	3.67
	34	0.18	8.83	331.95	26.6	3.68
	46	0.62	30.82	883.09	34.9	3.68

continua...

continuação tabela 31

Linhagens	Tempo de	U / ml	U total (U x 50 ml)	Uesp	Massa	pH
	Fermentação (horas)			(U total / g.m. seca)	Seca (mg)	
FP/83 (parental)	52	1.02	50.95	1.539.27	33.1	3.59
	58	1.43	71.61	1.850.39	38.7	3.56
	70	1.39	69.31	1.536.81	45.1	3.79
	76	2.38	118.89	2.421.38	49.1	3.59
	82	1.82	31.15	2.119.77	43.0	3.57
	95	2.70	134.98	2.705.01	49.9	3.63
	100	3.14	156.97	3.375.70	46.5	3.63
	106	3.03	151.48	3.749.50	40.4	3.61
	119	3.30	164.81	3.914.73	42.1	3.71
	130	4.21	210.39	4.302.45	48.9	3.70
	142	5.23	261.36	4.259.06	50.8	3.85
	154	3.89	194.74	3.553.65	54.8	3.70
	166	5.42	271.13	4.894.04	55.4	3.88
	175	6.19	309.52	5.458.91	56.7	3.83
	197	7.50	375.29	6.223.71	60.3	4.19

Figura 13 - Cinética de crescimento com avaliação da atividade enzimática do mutante (1/4) e seu parental (FP/83).

4.10. Preservação de linhagens

A produção de substâncias industrialmente importantes pode depender de fatores relevantes ligados ao método de preservação empregado (CALAM, 1964; KIRSOP, 1986). Na literatura empregada especializada encontram-se descritos vários procedimentos aplicáveis a diferentes gêneros e espécies (SMITH & ONIONS, 1983; GROUT, 1993). Entretanto, a literatura serve como orientação, mas o assunto muitas vezes ainda depende da experiência empírica (HILL, 1981).

A utilização de um único método de manutenção até se adquirir ampla experiência com determinados microrganismos é frequentemente

desaconselhada (SILVA, 1990), sendo mais seguro o emprego de mais de uma forma de preservação. Assim sendo, por este, entre outros motivos, aplicou-se para as linhagens isoladas e selecionadas neste trabalho dois métodos de preservação: liofilização e criopreservação.

A Tabela 32 apresenta os resultados obtidos quanto a viabilidade celular (ufc/ml) das linhagens fúngicas selecionadas neste trabalho após submetidas à liofilização. Entre as sete linhagens avaliadas, verificou-se que a liofilização promoveu uma redução na viabilidade celular de duas a quatro vezes, mantendo-se na mesma ordem em termos de base logaritmica para algumas linhagens (P/42, FP/69 e FP/107).

Uma redução imediata devido ao congelamento e à secagem são normalmente esperados, pois tais procedimentos geram stress considerado suficiente para causar morte celular. Perdas desta ordem são, portanto, consideradas normais. De qualquer modo, um monitoramento posterior faz-se necessário, pois as condições de armazenamento, umidade residual e ausência de vácuo nas ampolas são fatores que podem contribuir para a mortalidade celular ao longo do tempo, a despeito do sucesso inicial do método (KIRSOP, 1984).

A linhagem FP/83 mostrou-se mais sensível, pois cerca de 90 a 99% da viabilidade foram perdidos imediatamente após a liofilização, apresentando queda de 10^8 para 10^7 , como observa-se na Tabela 32. Após 3 meses de estocagem em refrigerador, as contagens de viáveis mostram que 4 culturas mantiveram aproximadamente os valores obtidos após a liofilização. Apenas 2 culturas (FP/46 e FP/76) apresentaram perdas adicionais, as quais podem ser devidas aos fatores acima mencionados, como umidade residual, ausência de vácuo, exposição à luz, além de sensibilidade particular da linhagem.

Uma maneira simples de se manter elevado o número de esporos viáveis seria concentrar ao máximo a suspensão inicial de protetor. Entretanto, a perda poderia continuar ocorrendo como resultado do congelamento e liofilização.

Tabela 32: Viabilidade de culturas fúngicas (Ufc/ml) submetidos à liofilização (os valores representam médias de 3 repetições).

Cultura	Antes da liofilização	Período	
		Após a liofilização	3 meses de estocagem
FP/42	$4,6 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$
FP/46	$4,2 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$
FP/69	$4,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$
FP/76	$2,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$3,1 \times 10^5$
FP/83	$1,9 \times 10^8$	$2,0 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$
FP/107	$2,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$

Com relação às linhagens fúngicas produtoras de pectinases oriundas de coleções (Tabela 33), quando mantidos também por liofilização, apresentaram comportamento inicial mais satisfatório, já que todas as linhagens mantiveram a viabilidade celular da mesma ordem antes e imediatamente após o processo. Após dois anos de armazenamento, três linhagens apresentaram decréscimo, sendo *Aspergillus oryzae* (FP/107) a mais sensível, permitindo, no entanto, a recuperação de cerca de 10^3 ufc/ml.

Os isolados, quando mantidos por criopreservação em nitrogênio líquido (Tabela 34), mostraram, em sua maioria a manutenção da mesma ordem de viabilidade celular antes e depois do congelamento, apenas uma das linhagens mostrou-se mais sensível (FP/42).

Tabela 33: Viabilidade de esporos fúngicos (Ufc/ml) submetidos à liofilização. Cada valor é média de três repetições.

Linhagens	Antes do Estoque	Período	
		Após o Estoque	2 anos de estocagem
<i>Aspergillus awamori</i> AWG 547 (FP/105)	$8,0 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
<i>Aspergillus tamarai</i> (FP108)	$7,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$
<i>Aspergillus niger</i> - ATCC 1025 (FP/104)	$3,0 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$
<i>Aspergillus oryzae</i> (FP/107)	$6,7 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3$
<i>Aspergillus niger</i> NRRL 3122 (FP/103)	$5,3 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$
<i>Aspergillus awamori</i> NRRL3112 (FP/106)	$4,7 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$

Após dois meses de armazenamento, sete das linhagens mantiveram a viabilidade próxima dos valores observados depois do congelamento, sendo a FP/76 e a FP/107 as que apresentaram decréscimo adicional. Outras linhagens mostraram sensibilidade a um ou outro método imediatamente após a preservação ou após o estoque prolongado, não seguindo, no entanto, uma regra geral. Deve-se ter ainda em mente que, embora cada resultado seja a média de três repetições, os volumes avaliados são pequenos e o erro do método de contagem pode ser considerável, o que poderia acarretar imprecisões nos valores obtidos. De qualquer modo, a recuperação pode ser considerada eficiente, pois altos valores foram mantidos pelos métodos empregados.

A linhagem FP/83, escolhida para a continuidade dos trabalhos, não se mostrou sensível nem à liofilização, nem à criopreservação, mantendo altos os níveis de viabilidade nos períodos em que foi avaliada. Os mutantes obtidos foram igualmente submetidos aos dois métodos. O subcultivo foi empregado apenas nas fases iniciais de manutenção dos isolados, até se confirmar a eficiência dos outros métodos para as linhagens. As culturas continuarão a ser acompanhadas no que concerne à viabilidade celular, em intervalos mais longos entre cada avaliação, como parte da rotina do banco de microrganismos do AB-DQ / IPT.

Tabela 34: Viabilidade dos esporos das linhagens fúngicas isoladas neste trabalho, mantidas por criopreservação em nitrogênio líquido (Ufc/ml).

Linhagem	Antes do Congelamento	Período	
		Após o Congelamento	2 meses
FP/42	$1,9 \times 10^9$	$9,7 \times 10^8$	$7,7 \times 10^8$
FP/46	$1,9 \times 10^9$	-	$1,1 \times 10^9$
FP/69	$1,5 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$
FP/76	$3,2 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$9,8 \times 10^7$
FP/83	$4,4 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
FP/107	$3,5 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$	$7,2 \times 10^7$

A capacidade produtora de enzimas foi avaliada para as culturas isoladas neste trabalho, quando preservadas por liofilização e nitrogênio líquido. Foi empregado o índice de relação enzimática (IRE). Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 35 e 36. Tais resultados mostraram-se

bastante variáveis, já que o método apresentou grandes limitações, entre as quais a dificuldade de padronização dos inóculos empregados.

Tabela 35: Acompanhamento da produção de enzimas através da medida do IRE* das linhagens fúngicas liofilizadas.

Método		Preservação- liofilização	
Número de fungos	antes	depois	após 2 meses de estoque
FP/42	1.16	1.49	1.15
FP/46	1.29	1.84	1.12
FP/69	1.18	1.37	1.12
FP/76	1.14	1.44	1.07
FP/83	1.00	-	1.26
FP/107	1.08	1.12	1.16

OBS.: Estes resultados representam o valor médio da leitura de 3 placas.

* IRE - Índice de relação enzimática.

Tabela 36: Acompanhamento da produção de enzimas através da medida do IRE*, das linhagens fúngicas mantidas por criopreservação.

Método		Preservação- nitrogênio líquido	
Número de fungos	antes	depois	após 2 meses de estoque
FP/42	1.16	1.04	1.13
FP/46	1.29	-	1.12
FP/69	1.18	1.08	1.17
FP/76	1.14	1.10	1.11
FP/83	1.00	-	1.32
FP/107	1.08	1.18	1.14

* IRE - Índice de relação enzimática.

Embora alguns autores acreditem que o IRE não deva ser aplicado na comparação entre espécies diferentes, restringindo o seu emprego para a comparação entre variantes de uma mesma espécie (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1975), pode-se imaginar que um grande número de repetições seja necessário, bem como uma padronização rígida do inóculo; do contrário, apenas diferenças bastante grandes poderão ser evidenciadas. O método como tal poderia ser empregado apenas no sentido de verificar se a linhagem perdeu ou não a capacidade produtora, ou seja, em termos apenas qualitativos.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

- O uso da seleção de fungos em meio sólido através dos parâmetros IRE e ADE não se mostraram eficientes, levando a resultados contraditórios quanto à indicação daqueles mais promissores na produção de enzimas pectinolíticas. Assim, a necessidade do estabelecimento de métodos rotineiros mais rápidos e eficazes torna-se premente. Considerações quanto às diferentes formas de interpretação que tais métodos podem sofrer devem ser feitas. Ademais, a elaboração dos meios empregados na seleção tanto em meio de cultivo sólido quanto em cultura submersa requer preocupação com a relação C/N destes, para se evitar entre outros problemas, o efeito de repressão catabólica. É de extrema importância que tais deficiências sejam superadas.

- A seleção em cultura submersa, também apresentou outras limitações, pois durante o "screening", devido ao tempo relativamente longo para as análises e ao grande número de isolados, tornava-se inviável a repetição dos testes fermentativos durante a primeira seleção; tanto para tomada de maior número de amostras, como para confirmação dos resultados obtidos, tendo sido realizado apenas uma medida no tempo de 72 horas de fermentação. Parece claro, no entanto, que o emprego deste método na seleção/comparação entre linhagens é melhor que em meio sólido pois elimina diferenças de inóculos; é menos subjetivo embora mais trabalhoso, pois se faz um controle (branco) para cada linhagem. Isto possibilita avaliações e conclusões mais precisas, valendo a pena o seu uso para "screening" em trabalhos de pesquisas, dependendo do número e importância das linhagens utilizadas.

- A seleção em cultura submersa permitiu a obtenção da linhagem de *Trichoderma harzianum* Rifai (FP/83), que mostrou-se promissora por apresentar valores de atividade enzimática superiores àqueles obtidos pelas outras linhagens selvagens, bem como pela linhagem de *Aspergillus oryzae* (FP/107) utilizada como padrão. Foi possível também verificar no presente trabalho uma alta variabilidade natural entre os isolados quanto à produção de enzimas pectinolíticas.
- A linhagem selecionada (FP/83) apresentou características interessantes para estudos genéticos e de melhoramento para produção de enzimas pectinolíticas. A avaliação preliminar dessa linhagem evidenciou a presença de conídios verdes e uninucleados, facilidade na obtenção de mutantes morfológicos com luz ultravioleta, crescimento rápido em meio mínimo e capacidade de produzir enzimas pectinolíticas.
- A linhagem mutante 1/4 obtida no presente trabalho demonstrou sua superioridade, apresentando valores de atividade enzimática cerca de duas vezes maior que àquelas apresentadas pelo seu parental (FP/83), indicando sucesso no uso do método clássico de mutação-seleção sobre esta linhagem.
- Os métodos de preservação aplicados para as linhagens fúngicas isoladas neste trabalho, bem como para àquelas já existentes no Banco de Linhagens do Laboratório de Microbiologia Industrial do AB-DQ / IPT, quais sejam, liofilização e criopreservação em nitrogênio líquido, mostraram-se em geral muito eficientes, mantendo a viabilidades destas a níveis bastante elevados.
- Através da análise realizada entre os parâmetros utilizados em meio sólido e líquido, foi possível verificar uma baixa correlação entre os dois métodos de seleção. Tais análises também apontaram como mais adequado o método de seleção em cultura submersa, e neste os parâmetros indicados como melhores foram a Unidade total enzimática (Utotal) e o Índice clássico de SMITH (1936), combinando Utotal e Massa seca.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, G. & HUITRON, C. Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp by galacturonic acid and glicose addition. **Enzyme Microbiol Technology**, Stoneham, **9** (11): 690-6, Nov. 1987.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Media handbook. ATCC, Maryland, 1984, 98p.

ANGELOVA, M.; GRIGORON, I.; NIKOLOVA, N. mRNA stability responsible for polymethylgalacturonase biosynthesis of *Aspergillus niger* 26 strain. **Doklady Akademiyi Nauk**, New York, **39** (8): 93-5, 1986.

AUNSTRUP, K. Production, isolation and economics of extracellular enzymes. In: WINGARD, L.; KATZIR, E.K.; GOLDSTEIN, L. ed. **Applied Biochemistry and Bioengineering**, New York, Academic Press, 1979. v.2, p. 27-69.

AZEVEDO, J.L. Melhoramento genético de microrganismos e sua aplicação a hidrólise enzimática de biomassas. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 2., Maringá, 1985. **ANAIS** Maringá, FUEM, 1985. p.93-106.

AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. São Paulo, Nacional, Ed. Nacional, 1973. 288p.

- BAGALHI, E. Parameiose em *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1987. 123p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- BAILEY, M.J. & PESSA, E. Strain and process for production of polygalacturonase. **Enzyme Microbiol Technology**, Stoneham, **12** (4): 226-71, Apr. 1990.
- BARFORD, H.C. **Essay in applied microbiology**. New York, John Wiley & Sons, 1981.
- BECKHORN, E.J.; LABBEE, M.D.; UNDERKOFER, L.A. Production and use of microbial enzymes for food processing. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, **13** (1): 30, 1965.
- BECKHORN, E.J. Production of industrial enzymes. **Wallerstein Laboratories Communications**, New York, **23**: 201-11, 1960.
- BERTOLINI, O.A. Isolamento e Biologia de novos fungos celulolíticos. Piracicaba, 1987. 63p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- BISSET, J. A revision of the genus *Trichoderma*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, **62**: 924-31, 1984.
- BOOTH, C. **The genus *Fusarium***. Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1971.
- BOOTH, I.R. & HIGGINS, C.F. eds. **Regulation of gene expression: 25 years on**. Cambridge, Cambridge University Press, 1986.
- BUELL, C.B. & WESTON, W. H. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungus cultures. **American Journal Botany**, Lawrence, **34**: 555-61, 1947.

BULL, A.T.; ELLWOOD, D.C.; RATLEDGE, C. The changing science in microbial technology. **Society for General Microbiology Symposium**, London, **29**: 1-28, 1979.

CALL, H.P.; WALTER, J.; EMEIS, C.C. Maceration activity of an endopolygalacturonase from *Candida macedoniensis*. **Journal Food Biochemistry**, **9** (4): 325-48, 1985.

CALAM, C.T. The selection, improvement and preservation of microorganisms **Progress Industrial Microbiology**, New York, **5**: 1-54, 1964.

CARVALHO, C.M.V. Condição, obtenção de mutantes, heterocariose e atividade celulolítica na linhagem selvagem *Trichoderma* sp. Belo Horizonte, 1989. 141p. (Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG).

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, London, **70**: 181-4, 1967.

DEMAIN, A.L. Theoretical and applied aspects of enzyme regulation and biosynthesis in microbial cells. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, New York, **3**: 21-32, 1972.

DEVEL, H. & STUTZ, E. Pectic substances and pectic enzymes. **Advances in Enzymology**, New York, **20**: 341-82, 1958.

DIANOVA, O.P.; MARTAKOV, A.A.; BANKOZHITENKO, R.G.; NOVIKOVA, A.S. Selection of a producer of pectolytic enzymes by using mutagenic factor. **Inedy Instituta Mikrobiologii i Virusologii, Akademiya Nauk Kazakhskoi SSR**, Moscow, **15**: 149-63, 1970.

DURRANDS, P.K. & COOPER, R.M. Development and analysis of pectic screening media for use in the detection of pectinase mutants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, **28**: 463-7, 1988.

DUVE, C. de. **A guided tour of the living Cell**. New York, Scientific American Books, 1985.

ENDO, A. Productions of pectic enzymes. **Hakko Kyokaishi**, Tokyo, **20**: 282-7, 1962.

FOGART, W.M. & KELLY, C.T. Pectic enzymes. In: FOGART, W.M., ed. **Microbiology Enzymes and Biotechnology**. London, Applied Science publishers, 1983. Cap 3, p. 131-82.

FREEDMAN, R.B. & HAWKINS, H.C. eds. **The Enzymology of post translational modification of proteins**. London, Academic Press, 1990. v.1.

FRIDURIK, J. Synthesis of a pectinolytic complex by *Aspergillus niger* 71, under conditions of submerged culture. **Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Sectio C.**, Lublin, **36**: 37-50, 1983.

FRIESE, E.; LANCHTENBERGER, A.; MAREK, E. Improved manufacture of pectinolytic with immobilized fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, **286**: 144-7, 1987.

FUNGARO, M.H.P. Genética e melhoramento de *Candida sp* para a produção de coalho microbiano. Piracicaba, 1990. 119p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

GACESA, P. & HUBBLE, J. **Enzyme Technology**. New York; Open University Press, [198-].

GHILDYAL, N.P.; RAMAKRISHNA, M.; LOSANE, B.K.; KARANTH, N.G.
Gaseous concentration gradients in tray type solid state fermentors - Effect on yields and productivities. **Bioprocess Engineering**, **8**: 677-72, 1992.

GODFREY, T. Enzymes for industry in the 90s. **Industrial Biotechnology**, Edinburg, **6** (1): 95, 1986.

GOLDMAN, G.H. Estudos genéticos e produção de celulases em *Aspergillus niger*. Piracicaba, 1988. 153p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz/USP)

GOODENOUGH, P.W.; CLARK, D.C.; DURRANT, A.J. Structural analysis by circular dichroism of some enzymes involved in plant cell wall degradation. **Febs Letters**, Amsterdam, **282**, (2): May 1991.

GRATZNER, H.G. Cell wall alterations associated with the hyperproduction of extracellular enzymes in *Neurospora crassa*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **111**: 443-6, 1972.

GREENE, H.C. & FRED, E.B. Maintenance of vigorous mould stock cultures. **Industrial Engineering Chemistry**, New York, **26**: 1297-9, 1934

GYSLER, C. Isolation and structure of the pectin lyase D-encoding gene from *Aspergillus niger*. **Gene**, Amsterdam, **89** (1): 101-8, 1990.

HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulose activity of microorganisms. **Journal of General Microbiology**, London, **98**: 105-15, 1977.

HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, New York, **67**: 597-607, 1975.

HILL, L.R. Preservation of mirorganisms In: NORRIS, M.H.R., ed. **Essays in Applied Microbiology**. Chichester, John Wiley & Sons, 1981. p. 1-30.

- HILL, L.R.; KOCUR, M.; MALIK, K.A. Culture and maintenance. In: HILL, L.R. & KIRSOP, B.E. **Living resources for biotechnology - Bacteria**. Cambridge, Cambridge University Press, 1991. p. 62-78.
- HOLLAND, I.B.; MACKMAN, N.; NICAUD, J.M. Secretion of proteins from bactéria. **Biotechnology**, **4**: 427-431, 1986.
- HUANG, X. Isolation and purification of polygalacturonas. **Shipin Kexue**, Osaka, **101**: 15-8, 1988.
- KAWAMORI, M.; MORIKAWA, Y.; SINSHA, Y. Preparation of mutants resistant to catabolic repression of *Trichoderma reesei*. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, **49** : 2875-9, 1985.
- KIRSOP, B. E. Culture collections - Their services to biotechnology. **Trends in Biotechnology**, New York, **1**: 1-8, 1983.
- KIRSOP, B.E. **Maintenance of microorganism a manual of laboratory methods**. KIRSOP, B.E. & SNELL, J.J., eds. London, Academic press, 1984.
- KIRSOP, B.E. **Service culture collection**: Campinas, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1986.
- KIRSOP, B.E. & HENRY, J.E. Development of a miniaturised cryopreservation method for a wide range of yeasts, **Cryoletters**, Cambridge, **5**: 191-200, 1984.
- KLACIK, M.A. Enzymes in food processing. **Chemical Engineering Progress**, May 1988.
- LARIOS, G.; GARCIA, J.M.; HOUTRON, C. Endo-polygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus* sp CH-Y-1043. **Biotechnology Letters**, Kew, **11** (10): 729-34, 1989.

- LIMA, A. V.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo, Edgard Blucher, 1975. 285p. (Biotecnologia, 1).
- LIN, M.T. & DIANESE, J.C. A coconut agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* sp. **Phytopathology**, St. Paul **66**: 1466-9, 1970.
- LINEWEAVER, H. & JANSEN, E.F. Pectic enzymes. **Advances Enzymology**, New York, **11**: 267-95, 1951.
- MAIORANO, A.E. Produção de pectinase por fermentação em estado sólido. São Paulo, 1990. 262p. (Doutorado - Escola Politécnica/USP).
- MAIORANO, A.E.; PERES, C.S.; GUEDES, T.M.M. **Estudo técnico-econômico de avaliação de oportunidades em enzimologia**. São Paulo, IPT, 1987.
- MALDONADO, M.C. & CALLIERI, D.A.S. Influence of enviromental conditions on the production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, **5** (3): 327-33, 1989.
- MALIK, K.A. Preservation of microganisms by simple methods. In: WORKSHOP ON PRESERVATION OF MICROORGANISMS. Maryland, 1988. Maryland, Univ. Maryland, 1988. p. 27-9.
- MANACHINI, P.L.; PARINI, C.; FORTINA, M.G. Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. **Enzyme Microbiology Technology**, Stoneham, **10** (11): 682-5, Nov. 1988.

- MANDELS, M. Growth and cellulases production by *Trichoderma*. In: BAILEY, M.; *et al.* **Symposium on the enzymatic hydrolysis of cellulose**. Helsinki, The Finnish National Fund for Research and Development, 1975. p. 81-109.
- MARTIN, S.M. & SKERMAN, B.D. **World directory of micro-organisms**. New York, Wiley Interscience, 1972.
- MCKAY, A.M. A plate assay method for the detection of Polygalacturonase secretion. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, **56** (3): 335-58, 1988.
- McLLAVINE, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, **49**,(1): 183, Nov.1921.
- MONOSCO, I.L. Produção de enzimas extracelulares em haplóides, heterocáries e diplóides de *Aspergillus nidulans*. Campinas, 1987. 93p. (Mestrado - Universidade de Campinas /UNICAMP).
- MONTENECOURT, B.S. & EVELEIGH, D.E. Preparation of mutants of *Trichoderma* with enhanced cellulase production. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, **34**: 777-82, 1977.
- MURAYAMA, T. & ISHIKAWA, T. Mutation in *Neurospora crassa* affecting some of the extracellular enzymes and several growth characteristics. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **115**: 796-804, 1973.
- NARAHARA, H.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, T.; PICHANGKURA, S.; UEDA, R.; TAGUCHI, H. Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. **Journal Fermentation Technology**, Tokyo, **60** (4): 311-19, 1982.
- PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. Manual de Técnicas eletroforéticas em microrganismos. Piracicaba, FEALQ, 1988. 54p.

- PARK, Y.K. **Influência do nitrogênio orgânico sobre a produção de alfa-amilase fúngica.** Campinas: ITAL, 1970. p. 191-194. (Coletânea do ITAL, 3).
- PARK, Y.K., FUJUKI, E., LIMA, D.C. Produção de enzimas pectinolíticas por fungos. **Revista Brasileira de Tecnologia**, v.3, p. 197-203, 1972.
- PARK, Y.K. & PAPINI, R.S. Produção de enzimas. In: LIMA, V.A., AQUARONE, E, BORZANI, W. (coord.). **Tecnologia das fermentações**. 3. ed. São Paulo: 1986. p. 182-211.
- PARK, Y.K. & PAPINI, R.S. Produção de enzimas industriais e sua aplicação no processamento de alimentos. **Boletim do Centro Tropical de Pesquisas e Tecnologia de Alimentos**, n. 16, dez. 1968.
- PEREIRA, J.O. Ocorrência do ciclo parassexual em uma espécie do gênero *Aspergillus*. Piracicaba, 1978. 108p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- PERKINS, D.D. Preservation of *Neurospora* stock cultures with anhydrous silica gel. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, 8: 591-4, 1962.
- PETRUCCIOLI, M., MONTELEONE, E., FREDERICI, F. Optimization of polygalacturonase production by *Aureobasidium pullulans* on orange pull waste. **Yeast**, v.5, p. 157-62, Apr. 1989.
- PITOMBO, R.N.M. A liofilização como técnica de conservação de material de pesquisa. **Ciência Cultura** (São Paulo), 41: 427-31, 1989.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, C.M.; McDONALD, K.D.; BUFTON, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances Genetics**. New York, 5: 141-238, 1953.

RIFAI, M.A. A revision of the gens *Trichoderma*. **Mycological Papers**, v.116, p.1-56, jan. 1969.

RODRIGUES, E.C. Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico *Humicola* sp. Piracicaba, 1987. 152p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

ROMBOUTS, F.M. & PILNIK, W. Research on pectin depolymerases in the sixties - A literature review. **Critical Review Food Science and Technology**, Boca Raton, 3: 1-26, Apr. 1972.

ROMBOUTS, F.M., PILNIK, W. Microbial enzymes and bioconversions. In: ROSE, A.H, ed. **Economic microbiology**, London, Academic Press, 1980. v. 5, p. 227-83.

ROMBOUTS, F.M., PILNIK, W. Pectinases and other cell-wall degrading enzymes of industrial importance. **Symbiosis**, Cambridge, 2: 79-90, 1986.

ROUMAS, N.E. Produção de celulases e fusão de protoplastos em *Humicola* sp. Piracicaba, 1988. 168p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

SCHIMENTI, J.; GARRETT, T.; MONTENECOURT, B.S. Selection of hypercellulolytic mutant of *Trichoderma reesei* based on resistance to nystatin. **Mycologia**, Lancaster, v.75, p.876-880. 1983.

SIÉSSERE, V. Otimização das condições de cultivo para produção e parcial caracterização das enzimas pectinolíticas de *Penicillium frequentans*. Piracicaba, 1991. 118p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

SILVA, L.F. Comparação de métodos de preservação de leveduras de interesse industrial. São Paulo, 1990. 152p. (Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas/USP).

SILVA, L.F.; KAMIYA, N.F.; OLIVEIRA, M.S.; ALTERTHUM, F. Comparison of preservation methods applied to yeast used for ethanol production in Brazil. **Revista Microbiologia**. São Paulo, **23** (3): 177-182, 1992.

SMITH, D. & ONIONS, A.H.S. The preservation and maintenance of living fungi. **Commonwealth Mycological Institute**, Surrey, Eng., 51 p, 1983.

SMITH, J.E. & BERRY, D. eds. The filamentous fungi. London: Edward Arnold Ltd, 1975.

SREENATH, H.K.; KOGE, F.; RADOLA, B.J. Macerating properties of a commercial pectinase on carrot and celery. **Journal Fermentation Technology**, Tokyo, **64** (1): 37-44, 1986.

STANBURY, P.F., WHITAKER, A. **Principles of fermentation technology**. New York: Pergamon Press, 1984.

STANDARD SPECIFICATIONS AND OPERATIONS INSTRUCTIONS (ASTM) for glass capillary kinematic viscometers, D-446-70. Philadelphia, 1970, v.23, p. 249.

STRZELCZYK, E.; DAHM, H.; KOWALSKY, S. The influence of pH and temperature on cellulolytic and pectolytic activity of *Cylindrocarpum destructans* (Zins) Scholt. **Journal Phytopathology**, Berlin, **120** (2): 97-103, 1987.

THOMPSON, J. P. Survival of *Azotobacteriaceae* desiccated over silica gel. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, **3**: 185-96, 1987.

TOYAMA, H.; YAMAGUCHI, K.; SHINMYO, A. Protoplast fusion of *Trichoderma reesei*, using immature conidia. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, **47**: 363-8, 1984.

TSUYUM, S.; ISHII, S.; NAKAMURA, M. Plate assay for differentiation of different pectinases. **Agriculture Biological Chemistry**, **53** (9): 2509-11, 1989.

VALADARES, M.C.C Genética e produção de exoenzimas em linhagens de *Metharizium anisopliae* var. *anisopliae* (Metsh.) Sorokin. Piracicaba, 1989. 160p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

VEGA, M. E. Aspectos da paramiose na fusão de protoplastos em *Metharhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. Piracicaba, 1990. 95p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

VICENTE, V. A. Isolamento e seleção de fungos lignocelulolíticos. Piracicaba, 1989. 172p. (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

VITOLO, M. **Tópicos de enzimologia industrial**. São Paulo, Litografia Corsário, 1981. 65p.

WALLERSTEIN, L. U. S. Pat. 995820 and 995823-6, 1911.

WISEMAN, A., ed. **Handbook of enzyme biotechnology**. 2.ed. Chichester, Ellis Horwood, 1985.

ZALDIVAR, M.; STEINER., J; MUSALEM, M. Aislamiento de um mutante de *Trichoderma pseudokoningi* hiperprodutor de celulasas. **Microbiologia**, Santiago, **3**: 33-44, 1987.