

OTIMIZAÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE
POLIGALACTURONASES PELO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp. SMIA-2
E PROPRIEDADES DA ENZIMA

MARCELA VICENTE VIEIRA ANDRADE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2009

OTIMIZAÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE
POLIGALACTURONASES PELO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp. SMIA-2
E PROPRIEDADES DA ENZIMA

MARCELA VICENTE VIEIRA ANDRADE

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof^a. Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2009

OTIMIZAÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE
POLIGALACTURONASES PELO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp. SMIA-2
E PROPRIEDADES DA ENZIMA

MARCELA VICENTE VIEIRA ANDRADE

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 10 de Fevereiro de 2009

Comissão examinadora:

Profa. Raquel Vieira de Carvalho (Doutora, Produção Vegetal) – UFES

Prof. Vitor Haber Perez (Ph.D. Engenharia Química) - UENF

Silvia Menezes de Faria Pereira (Doutora, Engenharia e Ciências dos Materiais) -
UENF

Profa. Meire Lelis Leal Martins (Ph.D. Microbiologia) - UENF
Orientador

DEDICO

Aos meus pais, *Elidivar* e *Maria*, por sempre estarem me apoiando, dando tudo de si, além de muito amor e carinho, pois não seria nada e não estaria onde estou sem a presença esforço e compreensão deles;

Ao meu noivo, *Paulo Maurício*, que mesmo longe sempre esteve comigo, disposto a ajudar-me com paciência e compreensão nos momentos que encontrei dificuldades ... Te amo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por estar em todos os momentos ao meu lado. Pela vida, pela saúde, pela família maravilhosa e por todas as oportunidades que sempre me deste. Sem ele eu nada seria;

Aos meus PAIS e IRMÃOS (ROSÂNGELA, LARISSA, GABRIEL e VANESSA) pelo imenso incentivo, respeito e amor sempre demonstrado. Agradeço por acreditarem em meu sonho;

Ao meu noivo PAULINHO, agradeço pela paciência, compreensão, amizade, companheirismo, respeito, sinceridade, força e seu imenso amor. Te amo meu lindo!!!!

À minha orientadora, MEIRE, por ter aceitado me orientar, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação, e, sobretudo por acreditar que eu era capaz;

A SILVIA, minha amiga e meu apoio de todas as horas, por aceitar fazer parte dessa banca de mestrado, pela paciência e atenção, pelo carinho e principalmente pelo companheirismo no período mais difícil, desde o meu início tumultuado e dos muitos choros, das muitas risadas, enfim da nossa amizade. Muito obrigada!!!!

A RAQUEL, por aceitar fazer parte dessa banca de mestrado, obrigada, apesar de não ter convivido muito com você no LTA, ainda deu tempo de aproveitar as conversas e o aprendizado durante o congresso em Brasília;

Ao VICTOR, que neste momento não gostaria de chamar de professor e sim de mais um amigo que conquistei no mestrado, nem sei por onde começar a

te agradecer! Muito obrigada pela paciência, pela amizade e pelo carinho sem esquecer dos puxões de orelha!

Aos colegas da pós-graduação e do Laboratório de Tecnologia de Alimentos pela troca de experiência, apoio e companheirismo durante minha trajetória;

Agradeço de forma especial a ANDRÉIA, poderia escrever um livro com todas as nossas risadas, nossos (principalmente meu) choros, pelas nossas mais inusitadas fotos em congressos. Irei sentir muita falta desses momentos, sem falar no trabalho divertido que fazíamos no laboratório, muito obrigada pela ajuda, pelo tempo que perdeu comigo podendo estar fazendo muitas outras coisas, pelo carinho e preocupação que sempre teve comigo;

Não posso esquecer da SILVANIA, no começo não tínhamos muita intimidade, mas quando começamos a conviver no laboratório e nas aulas, percebi que tinha encontrado mais uma amiga, sempre me ajudando, afinal de contas sempre nós três estávamos juntas (eu, Silvania e Andréia), nos experimentos, nas bagunças, nos dias tristes, nos felizes. Muito obrigada por todo carinho e paciência que teve comigo;

À minha avó DIVA por todas as orações que fez por mim, te dei muito trabalho vovó. Muito obrigada!!!

Às amigas JULIANA, DAMMI, LUCIANA COUTINHO, LUCIANA MORENO, LAURINHA, ALINE, NATALIA, CINTHIA, LUCIANA KONDA pelo apoio, companheirismo, pela maravilhosa convivência e muitos momentos de descontração;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pela oportunidade de realização do curso;

A UENF pela concessão da bolsa de estudo;

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	XII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Microrganismos termofílicos e suas enzimas	3
2.2. Substâncias pécticas	5
2.3. Enzimas pectinolíticas	6
2.3.1. Enzimas desmetoxilante ou desesterificante	7
2.3.2. Enzimas despolimerizantes	7
2.3.2.1. Liases	8
2.3.2.2. Hidrolases	8
2.4. Utilização de resíduos agroindustriais	9
2.5. Condições de cultivo	12
3. TRABALHOS	15

3.1. INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELO TERMOFÍLICO <i>Bacillus</i> sp.....	15
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. Microrganismo.....	19
2.2. Preparação do meio de cultura e condições de fermentação	19
2.3. Métodos analíticos	19
2.3.1. Manutenção do microrganismo e preparo do inóculo.....	19
2.3.2. Crescimento do microrganismo em cultura	20
2.3.3. Medida do crescimento e determinação do pH	20
2.4. Ensaio enzimático	20
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1. Efeito da concentração da água de maceração de milho e pectina de maçã/cítrica	21
4. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
3.2. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE USANDO O TERMOFÍLICO <i>Bacillus</i> sp. ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	28
RESUMO	28
ABSTRACT	29

1. INTRODUÇÃO	30
2. MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1. Microrganismo.....	31
2.2. Produção de poligalacturonase.....	31
2.3. Análise de enzima.....	32
2.4. Análises estatísticas.....	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
3.3. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE POLIGALACTURONASES PELO TERMOFÍLICO <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	42
RESUMO	42
ABSTRACT.....	43
1. INTRODUÇÃO.....	44
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1. Microrganismo e condições da cultura.....	45
2.2. Análise enzimática	46
2.3. Efeito do pH na atividade e estabilidade da poligalacturonase	46
2.4. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da poligalacturonase.....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1. Produção enzimática	47
4. CONCLUSÃO	53

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
4. RESUMO E CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

LISTA DE FIGURAS

Trabalho 3.1.

Figura 1. Efeito da concentração da água de maceração de milho: a) no crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2, b) na atividade enzimática e c) no pH final do caldo de fermentação; em meio de cultura contendo 0,5% de pectina cítrica ou de maçã incubado à temperatura 50°C por 36h. Símbolos: ■- pectina cítrica; □- pectina de maçã. 22

Figura 2. Crescimento e atividade de poligalacturonase de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em 0,5% de pectina cítrica e 0,5% de água de maceração de milho a 50°C e 150 rpm. Símbolos: (■) Atividade enzimática em U/mL; (○) Densidade Ótica a 600 nm e (▲) pH. 24

Trabalho 3.2.

Figura 1. Gráfico de Pareto ilustrando os efeitos referentes à produção de pectinase em nível de 95% confiança..... 35

Figura 2. Crescimento e atividade de poligalacturonase de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em 0,5% de pectina cítrica e 0,5% de água de maceração de milho a 50°C e 150 rpm. Símbolos: (■) Atividade enzimática em U/mL; (○) Densidade Ótica a 600 nm e (▲) pH. 37

Figura 3. Otimização (método gráfico) da produção de pectinase pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 em função da concentração da água de maceração de milho e pectina (valor de pH codificado = -1)..... 38

Trabalho 3.3.

Figura 1. Crescimento e atividade de poligalacturonase de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em 0,5% de pectina cítrica e 0,5% de água de maceração de milho a 50°C e 150 rpm. Símbolos: (■) Atividade enzimática em U/mL; (○) Densidade Óptica a 600 nm e (▲) pH. 48

Figura 2. Curva meio com água de maceração de milho (■) atividade da poligalacturonase; (●) pH; (◆) crescimento da poligalacturonase produzida pelo *Bacillus* sp. crescido em meio contendo 0,65% pectina, 0,65% água de maceração de milho em 50°C, e pH inicial de 8,0..... 49

Figura 3. (●) Temperatura ótima e (■) estabilidade da poligalacturonase produzida pelo *Bacillus* sp crescido em meio contendo 0,65% pectina e 0,65% de água de maceração de milho a 50°C, pH inicial de 8,0 por 36 horas. 100% da atividade enzimática = 242,2 U/mg de proteína..... 50

Figura 4. (■) pH ótimo da produção de poligalacturonase pelo *Bacillus* sp crescido em meio contendo 0,65% pectina, 0,65% de água de maceração de milho a 50°C, pH inicial de 8,0 por 36 horas. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem máxima (100% da atividade enzimática = 266,5 U/mg de proteína/galacturônico/min/mL)..... 51

Figura 5. (●) estabilidade relativa da produção de poligalacturonase pelo *Bacillus* sp crescido em meio contendo 0,65% pectina, 0,65% de água de maceração de milho a 50°C, pH inicial de 8,0 por 36 horas. Atividade relativa é expressa como uma porcentagem máxima (100% da atividade enzimática = 426,4 U/mg de proteína/galacturônico/min/mL). 52

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Matriz experimental segundo planejamento experimental completo 3^2 com três pontos centrais	33
Tabela 2. Produção de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 depois de 24 h de fermentação usando o planejamento experimental completo 3^2 com três pontos centrais.	34
Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para o modelo estatístico com 95% de nível de confiança.	36

RESUMO

ANDRADE, Marcela Vicente Vieira, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro, 2009. Otimização do meio de cultura para a produção de poligalacturonase pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2 e algumas propriedades da enzima. Orientadora: Meire Lelis Leal Martins. Co-Orientador: Victor Harber Perez.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes-RJ, com o objetivo de otimizar a produção da enzima poligalacturonase pelo termofílico *Bacillus* sp. cepa SMIA-2, utilizando o planejamento experimental como ferramenta e determinar algumas propriedades da enzima. O microrganismo secretou a poligalacturonase quando cultivado em meio líquido contendo 0,5% de pectina de maçã como fonte de carbono e 0,3% de água de maceração de milho como fonte de nitrogênio. Entretanto, a suplementação do meio de cultura com 0,5% de água de maceração de milho proporcionaram maiores níveis da enzima que alcançou a máxima atividade com 36 horas de incubação da cultura (39 U/mL). A otimização do meio de cultura foi realizada através do planejamento experimental do tipo ponto central para determinar a melhor concentração de pectina de maçã e água de maceração de milho no meio de cultura para a produção da enzima. As concentrações variaram de 0,3 a 1,0% com pH inicial do meio em escala de 6 a 10. As análises

estatísticas revelaram que a máxima produção da poligalacturonase foi alcançada com 0,3% de pectina, 1,0% de água de maceração de milho e pH inicial 6,0. Estudos sobre a caracterização da poligalacturonase revelaram que a temperatura ótima desta enzima foi 60°C. A enzima foi estável por 2 horas a temperaturas de 60°C e 70°C, mantendo níveis de atividade 82% e 63%, respectivamente. O pH ótimo da enzima encontrado foi de 10,0 com a atividade máxima de 266,5 U/mL. Após a incubação da enzima por 2 horas em pH 8,0 e 10,0, foi observado um decréscimo de aproximadamente 29% e 25% da atividade original. Em pH acima de 10,0 a estabilidade da poligalacturonase diminuiu, perdendo 80% de sua atividade original em pH 12,0.

ABSTRACT

ANDRADE, Marcela Vicente Vieira, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2009. Optimization of the culture medium for polygalacturonase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and some properties of the enzyme. Supervisor: Meire Lelis Leal Martins. Co-Supervisor: Victor Harber Perez.

This work was carried out at the Food Technology Laboratory of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ, with the objective of optimize the polygalacturonase production by thermophilic *Bacillus* sp. strain SMIA-2 using response surface methodological approaches and to determine some properties of the enzyme. The microorganism produced polygalacturonase when cultivated in liquid cultures containing 0.5% citric pectin as carbon source and 0.3% corn steep liquor as nitrogen source. However, the supplementation of the culture medium with 0.5% corn steep liquor provide higher levels of the enzyme that reached maximum activity at 36 hours of incubation of the culture (39 U/mL). The optimization of the culture medium was carried out through response surface methodological approaches to determine the best concentration of apple pectin and corn steep liquor in the culture medium for enzyme production. The concentrations varied from 0.3% to 1.0% with medium initial pH between 6.0 and 10.0. The results showed that the maximum polygalacturonase production was obtained with 0.3% pectin, 1.0% corn steep

liquor and pH 6.0. Studies on polygalacturonase characterization revealed that the optimum temperature of this enzyme was 70°C. The enzyme was stable at temperatures ranging from 60 and 70°C, maintaining levels of activity of 82% and 63%, respectively. The pH optimum of the enzyme was found to be 10.0 with activity of 266.5 U/mL. After incubation of enzyme for 2 hours at pH 8.0 and 10.0 was observed a decreased of about 29% and 25% of its original activity. At values of pH above 10.0 the stability of polygalacturonase decreased and loose 80% of its original activity at pH 12.0.

1. INTRODUÇÃO

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

As pectinases foram algumas das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente nas preparações de vinhos e sucos de frutas na década de 30 e seu uso tem aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias de alimentos, bebidas e vinhos, têxtil e de papel e celulose. Atualmente essas enzimas correspondem à cerca de 20% do mercado mundial de enzimas e são produzidas naturalmente por plantas, fungos, leveduras e bactérias. Estes microrganismos podem ser utilizados em processos fermentativos contendo resíduos provenientes do processamento de produtos agrícolas, utilizados como fonte de carbono para a produção de compostos de maior valor agregado, como etanol, proteínas, enzimas, aminoácidos e compostos de aroma.

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

Atualmente a escolha de novos microrganismos produtores de enzimas é talvez o maior obstáculo na comercialização de novas enzimas, isso devido ao

custo envolvido na produção desses catalisadores, esta insere o meio de cultura utilizada para o seu crescimento. Além do escasso número de linhagens termofílicas disponíveis em coleção para a pesquisa de enzimas termoestáveis específicas. Entretanto, a otimização das condições de cultivo, aliada à escolha de linhagens apropriadas, podem levar a uma melhor produção enzimática, além de reduzir os custos de produção.

Estudos estão sendo realizados visando à utilização de enzimas termoestáveis, sintetizadas por microrganismos termofílicos, em vários processos industriais. A maioria das bactérias termofílicas investigadas pertence ao gênero *Bacillus* e foram isoladas de ambientes termofílicos e mesofílicos. O grande interesse biotecnológico e comercial na utilização destes microrganismos se deve, dentre outros fatores, ao fato deles crescerem mais rápido, apresentarem sistemas enzimáticos mais estáveis, serem capazes de catalisar reações bioquímicas em temperaturas mais elevadas. Além disso, os problemas de contaminação são grandemente reduzidos quando se trabalha a temperaturas elevadas.

O grande interesse biotecnológico e comercial na utilização de microrganismos termofílicos se deve, dentre outros fatores, ao fato destes, estarem relacionados com sua alta capacidade de trabalhar em condições de elevadas temperaturas. Além disso, são capazes de catalisar reações bioquímicas em temperaturas extremas. Sendo assim, os problemas de contaminação são reduzidos quando se trabalha com essas linhagens de microrganismos termofílicos.

Considerando a grande potencialidade do emprego industrial de enzimas microbianas, este trabalho teve como objetivo otimizar a produção de poligalacturonase por uma espécie termofílica pertencente ao gênero *Bacillus* e determinar algumas propriedades da enzima.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microrganismos termofílicos e suas enzimas

Uma das mais surpreendentes propriedades dos microrganismos é sua habilidade em adaptar-se a ambientes extremos, nos quais fatores como pH, temperatura, pressão e concentração de sal ultrapassam os valores considerados como padrões para a maioria dos seres vivos (Gomes et al., 2007).

Os extremófilos, termo utilizado pela primeira vez por Mac Elroy em 1974, são microrganismos que sobrevivem e desenvolvem-se em condições extremas de temperatura, pressão, salinidade e pH. Incluem os termófilos, psicrófilos, piezófilos, halófilos, alcalófilos e acidófilos (Atomi, 2005) e se encontram bem distribuídos na natureza (Ferrer et. al., 2007).

A temperatura é um dos fatores ambientais que mais influencia o crescimento e a sobrevivência dos organismos (Madigan et. al., 1996; Fomenkova et. al., 1998). Os organismos capazes de sobreviverem em ambientes com temperaturas entre 50°C e 110°C são chamados de termofílicos, termofílicos extremos e hipertermofílicos. Existem espécies que foram isoladas em regiões vulcânicas continentais e submarinas, com temperaturas chegando até a 1000°C. São provenientes de fontes geotermiais ou mesmo de solos sob incidência de luz solar. Crescem em temperaturas de 60°C e 70°C e se agrupam em dois ramos filogenéticos: Eubactéria e Archaeabacteria (Archaea) (Woese et al., 1990).

Geralmente, os chamados termofílicos moderados são bactérias primárias classificadas como Eubacteria, e apresentam crescimento ótimo em temperaturas que variam entre 60°C e 80°C (Andrade, et al., 1999; Bertoldo e Antranikian, 2002). Por outro lado, os termofílicos extremos são classificados como Archaeabacteria e crescem a temperaturas de 80°C ou superiores (Woese et al., 1990).

A utilização de microrganismos termofílicos produtores de enzimas termoestáveis tem despertado um grande interesse biotecnológico e comercial. Isso se deve, entre outros fatores, ao fato de que estes microrganismos, quando comparados aos mesófilos, possuem uma maior velocidade de reação, apresentarem sistemas enzimáticos mais estáveis e serem capazes de catalisar reações bioquímicas em temperaturas mais elevadas (Oliveira et al., 2000). Além disso, a energia requerida para manter o sistema homogêneo é reduzida, pois sob alta temperatura, a solubilidade da maioria dos compostos é aumentada, ocorrendo diminuição da viscosidade do meio de cultivo (Wiseman, 1985; Zamost et al., 1991; Lévêque, et al., 2000; Lee et al., 2001; Asgher, et al., 2007).

Enzimas como pectinases, proteases, amilases, celulasas, xilanases, e outras isoladas de microrganismos termofílicos, devido às altas temperaturas em que atuam, têm sido extensamente utilizadas em setores industriais por prevenirem a contaminação microbiana por mesófilos, proporcionarem menor viscosidade ao meio, tornarem os reagentes mais solúveis facilitando a difusão dos mesmos e permitirem que concentrações maiores destes compostos sejam utilizadas. (Aguilar, 1996; Archana e Satyanarayana, 1997; Bruins et. al., 2001; Lee et. al., 2001; Van den Burg, 2003; Haki e Rakshit, 2003).

Espécies de *Bacillus* constituem os maiores produtores industriais de enzimas, com várias aplicações nas indústrias de detergentes, polpa e de papel, incentivando o isolamento destas espécies de uma grande variedade de ambientes como uma fonte de enzimas com atividades apropriadas. Poucos artigos avaliando estas espécies têm direcionado seus estudos para várias enzimas que degradam polissacarídeos como celulase, xilanase, xiloglucanase, mananase, pectato liase, e outras, tendo potencial em diferentes processos industriais (Martins e Hatti-Kaul, 2002).

2.2. Substâncias pécticas

As substâncias pécticas são polissacarídeos ácidos coloidais complexos, com uma cadeia principal composta de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligação α 1-4. Alguns açúcares neutros, tipicamente D-glucose, L-ramnose e L- arabinose e algumas vezes D-xilose e L-fucose, podem estar presentes formando as cadeias laterais da molécula (Kashyap et al., 2001). Os grupos carboxil do ácido galacturônico são parcialmente esterificados por grupos metil e parcialmente ou completamente neutralizados por sódio, potássio e íons amônio (Gummadi e Panda, 2003).

Essas substâncias são insolúveis em muitos solventes orgânicos. São solúveis em água, dimetilsulfóxido, formamida e glicerol. A solubilidade em água diminui com o aumento do grau de polimerização e muitas vezes é precedida por um lento intumescimento. Soluções aquosas de 1 a 2% (p/v) têm viscosidade relativamente alta, proporcional à massa molecular e também é influenciada pelo grau de esterificação, força iônica, pH e temperatura. Em soluções alcalinas, a baixas temperaturas ocorre saponificação dos grupos metil éster e, a altas temperaturas ocorre despolimerização do polissacarídeo (Sakai et al., 1993; Sharma e Satyanarayana, 2006).

As pectinas ou substâncias pécticas possuem alto peso molecular, sendo exclusivas de origem vegetal, presentes em todos os tecidos vegetais superiores, contribuindo para a firmeza e estrutura dos tecidos de plantas. São encontrados em quantidades variáveis, na lamela média e parede celular de todas as plantas superiores, não excedendo 1% do peso fresco. Sabendo-se que as substâncias pécticas são polissacarídeos estruturais para as células vegetais, sua degradação ou extração acarreta desintegração dos tecidos por separação celular, resultando em um processo denominado maceração. Na natureza o processo de maceração é prejudicial, pois promove a deterioração dos frutos e outros órgãos das plantas (Bailey e Pessa, 1990; Uenojo e Pastore, 2007).

A Sociedade Americana de Química (American Chemical Society) classificou as substâncias pécticas em: protopectina, ácido pectínico, ácido péctico e pectina, sendo estes três últimos total ou parcialmente solúveis em água (Alkorta et al., 1998; Kashyap et al., 2001).

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

Os ácidos pectínicos e pécticos são constituídos principalmente por unidades de ácido galacturônico; os primeiros apresentam uma porção considerável dos radicais carboxílicos esterificados por grupamentos metil, ao passo que as carboxilas dos últimos são essencialmente livres de metila. Os sais derivados da neutralização desses ácidos por bases mono ou bivalentes são denominados pectinato e pectato (Sakai et al., 1993; Wang et al., 2007).

O termo geral pectina designa ácidos pectínicos solúveis em água, com grau variável de grupos metil éster e um grau de neutralização capaz de formar gel com açúcares e ácidos em condições adequadas (Sakai et al., 1993). A forma nativa da pectina está localizada nas paredes celulares dos vegetais e pode estar interligada com outros polissacarídeos estruturais e proteínas para formar as protopectinas insolúveis (Kashyap et al., 2001).

2.3. Enzimas pectinolíticas

As pectinases foram uma das primeiras enzimas a serem utilizadas comercialmente nas preparações de vinhos e sucos de frutas ao redor de 1930 (Bhat, 2000; Kashyap et al., 2001). Durante as duas últimas décadas, o uso de celulasas, hemicelulasas e pectinases têm aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias de alimentos, bebidas e vinhos, têxtil e de papel e celulose (Bhat, 2000).

Em razão da grande diversidade de substâncias pécticas presentes em diferentes tecidos vegetais, existem várias enzimas capazes de degradar essas substâncias, que são denominadas enzimas pectinolíticas ou pectinases (Bailey e Pessa, 1990; Kaur et al., 2004).

As pectinases são responsáveis pela degradação das substâncias pécticas para fins nutricionais e são produzidas principalmente por bactérias, fungos,

leveduras e plantas superiores, não sendo sintetizadas por células animais, exceto por alguns insetos (Pardo et al., 1991; Jacob e Prema, 2006).

Algumas enzimas, incluindo pectinametilesterase, endo e exopoligalacturonase, pectato liase e pectina liase, através da ação sinérgica realizam a hidrólise da cadeia de pectina (Soares et al., 2001; Gummadi e Panda, 2003).

De acordo com Malvessi e Silveira (2004), as pectinases possuem diferentes mecanismos de ação sobre a estrutura poligalacturônica da molécula do substrato, podendo então ser classificada em dois grupos, segundo seu mecanismo de ação: enzimas desesterificantes e despolimerizantes.

2.3.1. Enzimas desmetoxilante ou desesterificante

A enzima que catalisa a desesterificação das substâncias pécticas é denominada pectina esterase (polimetilgalacturonato esterase, PMGE), catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, liberando metanol e pectato (Alkorta et al., 1998; Shen et al., 1999; Celestino et al., 2006). Estão presentes em praticamente todas as preparações enzimáticas comerciais e podem estar envolvidas em mudanças das substâncias pécticas durante o amadurecimento, estocagem e processamento de frutas e vegetais (Alkorta et al., 1998). Geralmente iniciam o ataque na posição adjacente ao do grupo carboxila livre (Whitaker, 1994).

De acordo com Shen et al. (1999), caracterizando a enzima pectina esterase, relatam a importância desta na primeira separação da cadeia de pectina, pois a pectina de baixa metoxilação liberada pode ser hidrolisada pela poligalacturonase e pectato liase.

2.3.2. Enzimas despolimerizantes

Em complemento às enzimas desesterificantes (pectina esterase), as despolimerases promovem a clivagem de ligações glicosídicas α -(1,4) e são classificadas conforme a especificidade da enzima pelo substrato (pectina ou

ácido péctico); ou também com relação à posição de clivagem na cadeia principal das substâncias pécticas, atuação ao acaso (endo-enzima) ou a partir da extremidade redutora ou não redutora do substrato (exo-enzima); ou de acordo com o mecanismo de reação de despolimerização (clivagem por β -eliminação ou hidrólise do substrato) (Bailey e Pessa, 1990; Uenojo e Pastore, 2007).

2.3.2.1. Liases

As liases são classificadas em pectina liase (PL) e pectato liase (PAL), de acordo com o substrato sobre o qual atuam.

A pectina liase (polimetilgalacturonato liase, PMGL) quebra as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona do substrato (pectina) (Gainvors et al., 1994; Whitaker, 1994; Karam e Belarbi, 1995; Uenojo e Pastore, 2007)

A pectato liase (poligalacturonato liase, PGL) catalisa a clivagem de ligações α -1,4 de ácido péctico (Kashyap et al., 2001) e requerem Ca^{2+} para atividade (Sakai et al., 1993; Mayans et al., 1997).

2.3.2.2. Hidrolases

As hidrolases incluem as polimetilgalacturonases e as poligalacturonases, podem apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise seqüencial) (Kashyap et al., 2001).

A polimetilgalacturonase (PMG) presumivelmente hidrolisa ligações α -1,4 de polimetilgalacturonatos (Rizzatto, 1999). Apesar de ser citada em algumas literaturas, sua existência é questionada por alguns autores (Sakai et al., 1993; Rizzatto, 1999).

A poligalacturonase (PG) hidrolisa ligações glicosídicas α -1,4 entre dois resíduos do ácido péctico (Mutlu et al., 1999). As poligalacturonases fúngicas são úteis pela alta atividade enzimática e possuem pH ótimo de atividade na região levemente ácida (Zheng e Shetty, 2000).

De acordo com o mecanismo de atuação das pectinases sobre molécula de substrato, estas podem ser classificadas em dois grupos: endopoligalacturonase, que promovem a hidrólise ao acaso da cadeia de pectato, e exopoligalacturonase, que hidrolizam a cadeia de pectato a partir da extremidade não redutora. A hidrólise do pectato ou de porções não esterificadas da cadeia de poligalacturonatos pela endopoligalacturonase produz uma série de oligogalacturonatos, podendo acumular mono, di e algumas vezes trigalacturonatos. Já a ação das exopoligalacturonases sobre a molécula de pectato provoca uma rápida liberação de grupos redutores (Rexová-Benková e Markovic, 1976; Kashyap et al., 2001; Celestino et al., 2006).

2.4. Utilização de resíduos agroindustriais

A economia brasileira é uma das mais importantes economias do mundo baseado na agricultura, produzindo e exportando café, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas, entre outros, o que significa uma ótima contribuição para o desenvolvimento da economia. Entretanto, a grande produção desses materiais agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos (Soccol e Vandenberghe, 2003).

De acordo com Pal et al. (1995) e Solis-Pereyra et al (1996), o bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo agroindustrial abundante em vários países e pode ser utilizado como matéria-prima para o desenvolvimento de vários processos biotecnológicos de interesse industrial assim como pode ser usado como suporte na produção de pectinases pelo *Aspergillus niger*.

A água de maceração de milho é produzida como um subproduto durante a produção de amido de milho. Este tem sido usado como uma fonte barata de nutrientes microbianos essenciais para uma variedade de propósitos. Já que constitui uma rica fonte em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato (Rivas et al., 2004).

Nos últimos anos houve um aumento na tentativa de tornar mais eficiente a utilização desses resíduos cuja disposição no meio ambiente causam sérios problemas de poluição. Uma das aplicações em potencial desses resíduos pode

ser a sua utilização como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de produtos químicos e de produtos de maior valor agregado como etanol, proteínas, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos e compostos de aroma (Medeiros et al., 2000; Soccol e Vandenberghe, 2003).

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

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

Outras áreas de aplicação incluem a indústria de papel, polpa, extração de óleo, fabricação de alimentos para bebê, elaboração de ração animal e indústria têxtil. Na indústria têxtil, pectinases têm sido empregadas na maceração do linho e no tratamento de fibras têxteis brutas, como a juta e o rami. As pectinases também estão sendo utilizadas na indústria de fermentados, como por exemplo, na fermentação do café, do cacau e do fumo (Bacarat et al., 1989; Uenojo e Pastore, 2007).

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

Enzimas pécticas contendo altos níveis de atividade de poligalacturonase, também são acrescentadas aos sucos de frutas para estabilizar o escurecimento

de sucos cítricos, purês e néctares (turvos). Alguns exemplos são descritos abaixo:

Como exemplo tem-se a pectina da laranja que é apenas parcialmente metilizada. Isto ocorre porque a laranja contém, naturalmente, grandes quantidades de pectinametilesterase, enzima que tira grupos metoxil de moléculas de pectina. Na presença de íons de cálcio, pectato insolúvel de cálcio é formado no suco da laranja, levando à precipitação indesejada de partículas escuras. No processo de extração do suco das laranjas, pectinases podem ser usadas em diferentes estágios, permitindo uma melhor extração de açúcares e sólidos solúveis, resultando em maior rendimento e, portanto, viscosidade mais baixa. O tratamento enzimático aumenta a estabilidade de escurecimento. Sendo muito importante usar pectinases com a atividade mais baixa de PME quanto for possível, para evitar a clarificação do líquido da polpa (Siliha e Pilnik, 1985).

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

Pectinases estão envolvidas no maceramento e desengomagem de juta, linho, cânhamo, rami e fibra da casca do coco. Maceramento é um processo de fermentação no qual certas bactérias (por exemplo, *Clostridium*, *Bacillus*) e certos fungos (por exemplo, *Aspergillus*, *Penicillium*) decompõem a pectina da casca e liberam fibra. Durante o maceramento da água do linho, a separação da fibra é causada por uma pectinase. O processo de degomagem, isto é, a retirada de substâncias pécticas da parede das células vegetais do caule, com a liberação das fibras celulósicas, é extensamente aplicada às fibras do linho (Geocze, 1994; Uenojo e Pastore, 2007).

A água eliminada pela indústria de processamento cítrico contém materiais pectináceos. Para o tratamento da água eliminada destas indústrias, vários processos foram investigados, incluindo: drenagem física, irrigação por pulverização, coagulação química, tratamento da lama ativado diretamente e

hidrólise química, seguida de fermentação do metano. Estes processos possuem algumas barreiras, como baixa eficiência devido à resistência química das substâncias pécticas, alto custo e longo período de tratamento, além da complexidade do processo. No entanto, pré-tratamento indireto por enzima pectinolítica produzida por bactérias e fungos foi suficiente para solubilizar quase todas as substâncias pécticas contidas na água eliminada (Kashyap et al., 2001).

2.5. Condições de cultivo

O metabolismo de pectina por fungos é muito pouco conhecido, mas o metabolismo de bactérias tem sido muito estudado. A degradação bacteriana de poligalacturonatos leva a produção de ácido D-galacturônico e ácido 4-deoxi-L-treo-5-hexoseulose urônico, metabolizados pelas vias metabólicas Entner-Doudoroff e pelo ciclo do ácido tricarboxílico (Maiorano, 1990).

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

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

Geocze (1994) também sugere que uma das razões pela qual a produção e atividade de enzimas pécticas variam com o pH, também está relacionada com a estabilidade do pH de cada enzima péctica.

Como o pH, a temperatura também tem seu papel de destaque, uma vez que afeta a viabilidade e o crescimento microbiano, o número de microorganismos no final do processo, a composição química e enzimática das células, como também suas necessidades nutricionais (kaur et al., 2004).

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

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

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

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

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

entre os diferentes microorganismos, assim como para diferentes enzimas (Bravo et al., 2000).

3. TRABALHOS

3.1. INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp.

**Marcela Vicente Vieira Andrade; Andréia Boechat Delatorre; Silvania Alves
Ladeira; Victor Haber Perez (*); Meire Lélis Leal Martins**

Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Av. Alberto Lamego, 2000, Pq. Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ-Brasil, 28013-602.

RESUMO

O termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2, produziu poligalacturonase quando crescido em meio contendo pectina (pectina de maçã ou cítrica). O meio de cultura foi suplementado com água de maceração de milho, do qual as concentrações foram variadas de 0,2 a 0,5%. Os experimentos foram conduzidos em shaker, a 50°C, 150 rpm e pH 7.5. A produção da enzima foi determinada em função da atividade

enzimática do extrato bruto de fermentação. Consequentemente, os resultados revelaram que o meio de cultura afetou tanto o crescimento celular quanto a produção enzimática. Além disso, a produção máxima da enzima foi encontrada com 36 horas, chegando a níveis de 39U/mL, sugerindo que esse processo foi parcialmente associado ao crescimento.

Palavras-chave: poligalacturonase termofílico *Bacillus* sp., fermentação submersa

ABSTRACT

EFFECT OF THE CULTURE MEDIUM ON THE POLIGALACTURONASE PRODUCTION BY SUBMERGED FERMENTATION USING TERMOPHILIC *Bacillus* sp.

Marcela Vicente Vieira Andrade; Andréia Boechat Delatorre; Silvania Alves Ladeira; Victor Haber Perez (*); Meire Lélis Leal Martins

Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Av. Alberto Lamego, 2000, Pq. Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ-Brasil, 28013-602

Thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2, produced polygalacturonase when grown on pectic medium (citric or apple pectin). The culture medium was supplemented with corn steep liquor, which concentration was varied from 0.2 to 0.5%. The experiments were conducted in shaker, at 50°C, 150 rpm and pH 7.5. The enzyme production was measured as a function of the enzymatic activity of the fermentation brutish extracts. Consequently, the results revealed that the culture medium affected both, cell growth and enzyme production. The enzyme production reached its maximum value at 36 h, reaching 39 U mL⁻¹, suggesting that this process was partially associated to the growth.

Key-word: polygalacturonase, thermophilic *Bacillus* sp., submerged fermentation

1. INTRODUÇÃO

Pectinases foram as primeiras enzimas a serem usadas na indústria. Sua aplicação comercial foi observada em 30 para a preparação de vinhos e sucos de frutas. Porém, apenas na década de 60, a composição química dos tecidos de plantas ficou esclarecida e com esse conhecimento, cientistas começaram a estudar e aplicar essas enzimas com maior eficiência. Como resultado, pectinases são hoje as enzimas que mais crescem no setor comercial, sendo produzidas principalmente por bactérias, fungos e leveduras (Ortega et al., 2004).

As pectinases são responsáveis pela degradação de pectina, uma molécula complexa, constituída basicamente por polissacarídeos estruturais parcialmente metoxilados, os quais estão presentes em todos os tecidos vegetais jovens. Atualmente estas enzimas possuem várias aplicações biotecnológicas, sendo consideradas como destaque no setor industrial. Assim, encontram aplicação na extração e clarificação de sucos de frutas e vinhos, na extração de óleos essenciais, na produção de alimentos para recém-nascidos, na fermentação do café e cacau, além de outras, como na indústria têxtil, especialmente no tratamento de fibras como o linho e o ramie (Malvessi, e Silveira, 2004).

A pectina desmetoxilada é chamada ácido poligalacturônico ou ácido péctico. Microrganismos podem degradar a pectina diretamente, por clivagem em oligômeros metoxilados, ou após desmetoxilação da pectina, ou mesmo, pela ação da enzima pectinaestarese (EC 3.1.1.11). A clivagem direta da pectina ou do ácido poligalacturônico pode ocorrer por hidrólise ou ação transeliminativa (Tardy, e Nasser, 1997).

A classificação das enzimas pécticas envolve dois grupos, a saber: a) aquelas que promovem a despolimerização das ligações glicosídicas do polímero péctico por hidrólises (hidrolases) ou por ação transeliminativa (liases), e b) as que promovem a saponificação das substâncias pécticas (pectinaesterases) conforme ilustrado graficamente (Uenojo e Pastore, 2007). As hidrolases são denominadas poligalacturonases e são subdivididas, quanto ao mecanismo de ação sobre a

cadeia de pectato, em endopoligalacturonases (endo-PG) ou poli (α-1,4-D-galacturonato) glicano-hidrolase (EC 3.2.1.15), as quais produzem uma série de oligogalacturonatos, tais como, mono, di, tri, e os tetragalacturonatos e exopoligalacturonases (exo-PG), classificadas como poli (α-1,4-Dgalacturonato) galacturono-hidrolase (EC 3.2.1.87), que atuam nas extremidades da cadeia de pectato (Sakai et al., 1993).

Comparativamente com outras enzimas, poucos trabalhos têm sido reportados sobre a produção de pectinases por via biotecnológica. Destes, a maior parte envolve a produção de pectinases por microrganismos mesofílicos (Contreras-Esquivel e Voget, 2004). Entretanto, enzimas de microrganismos termofílicos têm recebido considerável atenção da indústria por causa de suas características especiais, como estabilidade térmica e as altas mudanças de pH (Niture e Pant, 2004).

A produção de enzimas por microrganismos é influenciada pelas condições de fermentação e em particular pela composição do meio de cultura. Nas últimas décadas têm-se observado uma crescente utilização de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de enzimas, devido à incessante demanda de encontrar aplicações alternativas destes resíduos visando, não apenas a redução dos custos de produção, como também o desenvolvimento de processos mais amigáveis com o meio ambiente (Malvessi, e Silveira, 2004).

A água de maceração de milho, gerada como um subproduto da produção de amido de milho tem sido usada para a redução dos custos do meio de cultura para o crescimento e produção de enzimas por microrganismos (Kumar e Takagi, 1999). Assim, este resíduo pode ser um substrato atrativo para a produção de pectinases por microrganismos, porque além de beneficiar o meio de crescimento pelo fornecimento de fonte de nitrogênio, fornece vários micronutrientes, vitaminas e fatores estimulantes do crescimento microbiano (Rivas et al., 2004)

Este manuscrito, na busca por avaliar novas linhagens de cepas produtoras de pectinases, aborda o estudo da produção de poligalacturonase pelo *Bacillus sp* SMIA-2, uma linhagem termofílica isolada de solos da região Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro. Além disso, avalia o efeito da suplementação do meio de cultura com a água de maceração de milho, visando à obtenção de um meio de cultura mais econômico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste estudo foi o *Bacillus* sp. SMIA-2, uma bactéria termofílica, isolada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) a partir de amostras de solo do município de Campos dos Goytacazes-RJ (Nunes e Martins, 2001). O microrganismo foi conservado em meio TSY (triptona 20 g L⁻¹; NaCl 10 g L⁻¹; extrato de levedura 10 g L⁻¹; ágar 20 g L⁻¹ e água 1 L) sob temperatura de refrigeração.

2.2. Preparação do meio de cultura e condições de fermentação

O meio de cultura utilizado para a produção da poligalacturonase foi (g L⁻¹ de água destilada): pectina de maçã ou cítrica (5,0), peptona (1,0); KCl (0,03); K₂HPO₄ (0,09); MgSO₄ (0,05); CaCl₂ (0,03); ZnO (2,5×10⁻³); FeCl₃.6H₂O (2,7×10⁻²); MnCl₂.4H₂O (1,0×10⁻²); CuCl₂.2H₂O (8,5×10⁻⁴); CoCl₂.6H₂O (2,4×10⁻³); NiCl₃.6H₂O (2,5×10⁻⁴); H₃BO₃ (3,0×10⁻⁴) e Na₂MoO₄ (1,0×10⁻³). Este meio de cultura foi suplementado com água de maceração de milho nas concentrações de 0,2; 0,3 e 0,5%.

O meio acima foi preparado utilizando água destilada e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. O pH final foi ajustado para 7,5 com NaOH, antes da esterilização.

2.3. Métodos analíticos

2.3.1. Manutenção do microrganismo e preparo do inóculo

O inóculo foi preparado primeiro cultivando o microrganismo em placas de Petri contendo o meio TSY. As placas foram incubadas em uma estufa QUIMIS modelo Q-315-D-26 a 50 °C. Após 18 horas de incubação, 5 mL do meio mineral mínimo de crescimento foram pipetados para dentro das placas e as células sugadas, usando uma pipeta estéril. As células foram inoculadas em meio líquido

e incubadas por 12 horas. Estas células, então, foram utilizadas para inocular os erlenmeyers contendo o respectivo meio de crescimento.

2.3.2. Crescimento do microrganismo em cultura

O microrganismo foi cultivado nos meios descritos anteriormente, em incubadora horizontal TECNAL TE 420 a 150 rpm e à temperatura de 50 °C. Em todos os experimentos foram realizados três repetições, sendo cada uma constituída de 25 mL de meio de cultura em erlenmeyer de 250 mL. A intervalos de tempo determinados foram retirados frascos para medida da densidade ótica a 600 nm, pH, e dosagem da atividade da enzima nos filtrados da cultura.

2.3.3. Medida do crescimento e determinação do pH

A concentração celular foi medida, inicialmente, pela turbidez do meio. A turbidimetria foi medida em espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 600 nm. Além disso, as variações dos valores de pH durante o crescimento celular foram determinadas utilizando-se o pHmetro da marca WTW pH 330.

2.4. Ensaio enzimático

Alíquotas do meio de cultura foram centrifugadas a 4500 rpm por 15 minutos a 4°C em uma centrífuga modelo HERMLE Z382K, e o sobrenadante livre de células foi utilizado para dosagem da atividade da enzima. A atividade da poligalacturonase foi determinada em triplicata nos filtrados da cultura, incubando 0,2 mL da enzima bruta com 0,8 mL de solução de pectina cítrica a 0,5% dissolvida em tampão Glicina-NaOH (50 mM, pH 10,0) a 70°C por 10 minutos (Soares et al., 1999). A reação foi paralisada pela adição de 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) à mistura. Em seguida, esta mistura foi colocada em água em ebulição por 10 minutos e resfriada em banho de gelo (Miller, 1999). A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 540 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que o reagente de Miller (DNS) foi adicionado juntamente com a enzima à solução de pectina cítrica 0,5% e, esta mistura foi colocada em água em ebulição como descrito anteriormente. Uma

unidade de poligalacturonase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de ácido galacturônico por minuto a partir da pectina nas condições do ensaio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito da concentração da água de maceração de milho e pectina de maçã/cítrica

A suplementação do meio de cultura com a água de maceração de milho estimulou o crescimento de *Bacillus* sp SMIA-2 e a atividade da poligalacturonase (Figura 1). Resultados muito semelhantes foram reportados por Tari et al., 2006, onde a água de maceração de milho proporcionou um aumento bastante significativo na atividade da protease do *Bacillus* sp. L21. A influência desta fonte de nitrogênio também foi testada por Delatorre (2007), onde a água de maceração de milho a 0,2% proporcionou um bom crescimento e uma maior atividade da protease produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2, entretanto em concentrações maiores a atividade da enzima foi reprimida.

Da mesma forma, em um estudo realizado na obtenção da enzima transferase de *Aspergillus foetidus*, a água de maceração de milho foi das fontes de nitrogênio testadas, aquela que proporcionou a melhor atividade para essa enzima (Wang e Rakashit, 1999).

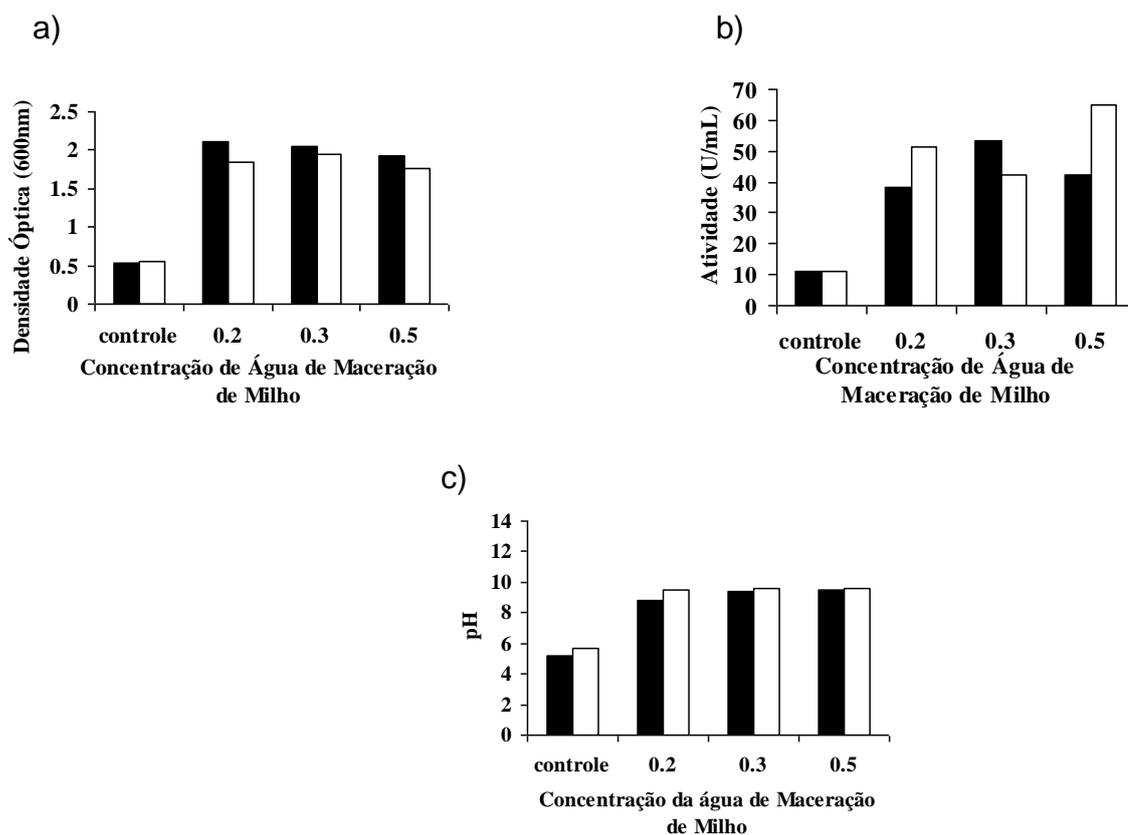


Figura 1. Efeito da concentração da água de maceração de milho: a) no crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2, b) na atividade enzimática e c) no pH final do caldo de fermentação; em meio de cultura contendo 0,5% de pectina cítrica ou de maçã incubado à temperatura 50°C por 36h. Símbolos: ■- pectina cítrica; □- pectina de maçã.

As condições do meio de cultivo que favoreceram o crescimento celular foram diferentes das que propiciaram uma maior atividade da poligalacturonase. Quando a pectina cítrica foi utilizada como fonte de carbono, a concentração da água de maceração de milho que promoveu maior atividade da poligalacturonase foi 0,3%.

Quando a pectina de maçã foi empregada, a melhor concentração da água de maceração de milho foi de 0,5%. Por outro lado, o aumento da concentração da água de maceração de milho para valores acima de 0,2% inibiu o crescimento do microrganismo quando a pectina cítrica foi utilizada como fonte de carbono. Entretanto, quando a pectina de maçã foi utilizada, observou-se inibição a concentrações acima de 0,3% (Figura 1b), ponto no qual se verificou a maior atividade da poligalacturonase. Estudos semelhantes foram realizados por

Cordeiro e Martins (2009), em que a melhor atividade de poligalacturonase foi encontrada quando a pectina de maçã, seguida pela pectina cítrica foram utilizadas como fonte de carbono.

Em relação ao pH final do meio, também foi observado que na medida em que se aumentou a concentração da água de maceração de milho até 0,3%, este parâmetro aumentou. Acima desta concentração, os valores do pH do meio não se alteraram (Figura 1c). Segundo Ming Chu, 1992, a acidificação ou alcalinização do meio de cultura reflete o consumo de substrato. Quando íons amônio estão sendo utilizados, o meio torna-se mais ácido e, quando nitrogênio orgânico (aminoácidos e peptídeos) está sendo assimilado, o meio torna-se mais alcalino.

O perfil da obtenção da poligalacturonase no decorrer do processo fermentativo está mostrado na Figura 2. O crescimento do microrganismo foi iniciado imediatamente após a incubação do meio de cultura, porém a secreção da enzima foi observada após 6 horas de incubação. A fase exponencial de crescimento do microrganismo foi alcançada durante as primeiras 12 horas de incubação. Após esse tempo, a velocidade de crescimento diminuiu marcando assim a fase estacionária da cultura. Esta produção mais tardia da enzima em relação ao crescimento sugere que a produção enzimática necessita de uma massa mínima de células para que o microrganismo consiga sintetizar suas enzimas (Delatorre, 2007). A atividade máxima da poligalacturonase foi observada após 36 horas de incubação atingindo aproximadamente 39 U mL^{-1} , quando o crescimento do microrganismo já havia cessado. Isto sugere que a indução efetiva da enzima não ocorre até que a fase estacionária seja alcançada e a fonte de carbono disponível esgotada. Subseqüentemente, os níveis da enzima caíram para aproximadamente 32 U mL^{-1} em 48 horas.

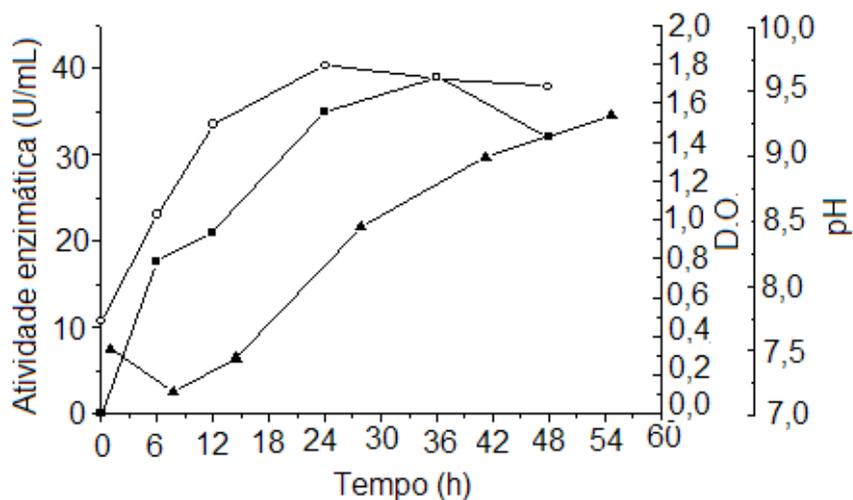


Figura 2. Crescimento e atividade de poligalacturonase de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em 0,5% de pectina cítrica e 0,5% de água de maceração de milho a 50°C e 150 rpm. Símbolos: (■) Atividade enzimática em U/mL; (○) Densidade Óptica a 600 nm e (▲) pH.

O perfil do pH também é mostrado na Figura 3. Observa-se uma queda no pH da cultura de 7,5 para 7,1 durante as primeiras 6 horas de incubação. Essa queda inicial do pH do meio pode ser devida à produção de ácidos orgânicos durante a fermentação da fonte de carbono, que é mais intensa nesse período.

Posteriormente, o pH do meio de cultura aumentou gradativamente para 9,3 depois de 48 horas de incubação. Resultados similares foram reportados por Sharma e Satyanarayana, 2006, os quais avaliaram o efeito de diversos parâmetros físico-químicos na produção de pectinase usando *Bacillus pumilus*. Estes autores observaram um incremento linear na produção de pectinase quando a razão Carbono/Nitrogênio foi reduzida ou quando o pH foi incrementado.

Devido a essa relação entre a síntese da poligalacturonase e a utilização de compostos nitrogenados, a variação do pH é utilizada para fornecer informações importantes sobre a produção de poligalacturonases, como o início e o final de sua síntese.

4. CONCLUSÃO

O *Bacillus sp* SMIA-2 mostrou a sua capacidade de produzir poligalacturonase em fermentação submersa contendo água de maceração de milho, pectina de maçã e cítrica. Neste contexto, foi verificado que o enriquecimento do meio de cultura usando resíduo de água de maceração de milho estimulou o crescimento microbiano e a produção da poligalacturonase. Por outro lado, a suplementação com pectina de maçã no meio de cultura juntamente com 0,5% de água de maceração de milho proporcionaram maiores níveis da produção desta enzima de acordo com os valores de atividade enzimática observados. Os resultados deste trabalho resultam atrativos para sua implementação na indústria e desta forma, estudos futuros deverão ser conduzidos visando à otimização deste processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Contreras-Esquivel, C.J.C., Voget, C.E. (2004) Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Journal of Biotechnology*, v. 110, p.21–26.
- Cordeiro, C.A.M.; Martins, M.L.L. (2009) Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus sp.*, e algumas de suas propriedades. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 29(1): 1-7.
- Delatorre, A. B. (2007) Utilização de resíduos agroindustriais par a produção de protease pelo microrganismo termofílico *Bacillus sp.* SMIA-2. Monografia - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ,34p.
- Kumar, C.G., Takagi, H. (1999) Research review paper Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv.* 17:561-594.

- Malvessi, E.; Silveira, M. M. (2004) Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Brazilian Archives of Biology and technology*, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 693-702.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*. 31: p. 426-428.
- Ming Chu, I.; Lee, C.; LI, T.S. (1992) Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme and Microbial Technology*.,v. 14, p. 755-761.
- Niture S.K.; Pant, A. (2004) Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. *Microbiology Resource*, v.159, p. 305–314.
- Nunes, A. S., Martins, M. L. L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Braz. J. Microbiol.*, 32:271-275.
- Ortega N, de Diego S, Perez-Mateos M, Busto MD, (2004) Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chem* 88: 209– 217.
- Rivas, B., Moldes, A.B., Biotecnol, J.M., Parajó, J.C. (2004) Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *Inter J of Food Microbiol*. 97:93-98.
- Sakai, T.; Sakamoto, T.; Hallaert, J. (1993) Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, New York, v. 39, p.213-294.
- Sharma, D.C, Satyanarayana, T. (2006) A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Biores Technol* 97: 727–733.
- Soares M.M.C.N., da Silva R, Gomes E, (1999) Screening of bacterial strains or pectinolytic activity : characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 30: 299-303.
- Tardy, F., Nasser, W., Robert-Baudouy, J., Hugovieux-Cotte-Pattat, N. (1997) Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *Journal of Bacteriology*, 179: p.2503-2511.
- Tari, C., Genckal, H., Tokatli, F. (2006) Optimization of a growth using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Process Biochemistry*. 41:659-665.
- Uenojo, M., Pastore, G.M. (2007) Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 388-394.

Wang, X.-D., Rakshit, S.K. (1999) Improved extracellular transferase enzyme production by *Aspergillus foetidus* for synthesis of isooligosaccharides. *Bioprocess Engineering*. 20:429-434.

3.2. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE POLIGALACTRONASE USANDO O TERMOFÍLICO *Bacillus sp.* ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Marcela Vicente Vieira Andrade, Silvania Alves Ladeira, Andréia Boechat Delatorre, Victor Haber Perez*, Meire Lelis Leal Martins*

Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego 2000, CEP 28015-620, Campos dos Goytacazes –RJ., Brasil.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar as melhores concentrações de fontes de pectina e água de maceração de milho no meio cultura e avaliar o pH inicial para a produção de poligalactronase pelo termofílico *Bacillus sp.* SMIA-2, isolado do solo de Campos dos Goytacazes - RJ. Os experimentos foram conduzidos em shaker orbital operando a 150 rpm a 50°C e por 36 horas em Erlenmeyer de 250 ml contendo 25 mL de meio. Os níveis de pectina e água de maceração de milho foram variados em uma escala de 0,3 a 1,0% enquanto o pH médio inicial foi de 6 a 10, de acordo com planejamento experimental 2³ com três pontos centrais. As análises estatísticas revelaram um efeito significativo para todas as variáveis sobre a produção de poligalactronase, em um nível de confiança de 95%. Desta forma, uma região experimental desejável de trabalho, resultado de otimização

gráfica foi determinada quando altos valores de produção de poligalactronase (>100 U/mL) foram atingidos. Uma alta atividade de poligalactronase secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 foi obtida usando como substratos resíduos agroindustriais.

Palavras-Chave: pectinase, poligalactronase, *Bacillus* sp., fermentação, planejamento experimental.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF POLYGALACTURONASE PRODUCTION BY BATCH CULTURE OF THERMOPHILIC *Bacillus* sp. SMIA-2 THROUGH STATISTICAL APPROACHES

Running title: Polygalacturonase production by *Bacillus* sp.

Marcela Vicente Vieira Andrade, Sylvania Alves Ladeira, Andréia Boechat Delatorre, Victor Haber Perez*, Meire Lelis Leal Martins*

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (*UENF*), Center of the Science and Farming Technologies (*CCTA*), Food Technology Laboratory (*LTA*)-Brazil

The aim of this work was to determine the optimum levels of carbon and nitrogenous sources such as pectin and corn steep liquor in the medium, respectively, and the best initial pH for polygalacturonase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2, isolated from Campos dos Goytacazes soil. Batch mode shake flask experiments were conducted at 50 °C and 150 rpm for 36 h in 250-ml Erlenmeyer flasks containing 25 mL of the media. The levels of pectin and corn steep liquor in the culture medium were varied in a range from 0.3 to 1%, while initial medium pH was varied from 6 to 10, according to 32 full experimental design with three center points. The statistical analysis revealed a significant effect

for all independent variables on the polygalacturonase production, at 95% confidence level. Thus, experimental desirable working region by graphical optimization was attained when high polygalacturonase production values (> 100 U/mL) were reached. A higher activity of polygalacturonase secreted by *Bacillus* sp. SMIA-2 was accomplished using cheap raw materials such as corn steep liquor.

Key-words: pectinase, polygalacturonase, *Bacillus* sp., fermentation, experimental design

1. INTRODUÇÃO

As pectinases são enzimas industrialmente importantes, as quais são responsáveis por aproximadamente, 25% do total de enzimas comercializadas no mundo, são largamente usadas na indústria de bebidas e na clarificação de concentrados de sucos de frutas e vinhos (Ortega et al., 2004 e Ustoki et al., 2007). Pectinases alcalinas são largamente utilizadas nas indústrias, por reterem as fibras dos vegetais como o linho, cânhamo e juta, biopreparação de algodão, polidor enzimático de juta algodão, clareamento do papel, no tratamento da polpa e de efluentes de fábricas de papel e para o melhoramento da qualidade do chá preto (Sharma e Satyanarayana, 2006).

Enzimas que hidrolisam substratos pécticos incluem a poligalactronase (exopoligalactronase e endo-poligalactronase), pectina esterase, pectina liase e pectato liase dependendo do seu modo de ação (Jayani et al., 2005). Em geral, a produção de enzimas pectinolíticas tem sido largamente reportada em plantas (Ali e Brady, 1982) e microrganismos usando bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Gupta et al., 2007).

Em ambos os processos de fermentação, submersos (Sharma e Satyanarayana, 2006) e em estado sólido (Jacob e Prema, 2006), têm sido usados para a produção de pectinase. De qualquer maneira, independentemente dos processos utilizados, muitos critérios, tais como: meio de cultura e condições

operacionais (temperatura, pH, agitação, etc.), entre outros devem ser considerados.

Por outro lado, o isolamento de outras espécies de bactérias para a produção de enzimas com novas propriedades é um objeto de grande relevância para a comunidade científica. Neste contexto, a bactéria termofílica *Bacillus* sp SMIA-2, usada neste trabalho, foi isolada de solos brasileiros da região Norte Fluminense do estado do Rio de Janeiro por Nunes e Martins (2001) e sua capacidade de produzir protease (Silva et al., 2007 e Nascimento e, Martins, 2006), amilase (Carvalho et al., 2008) e mais recentemente enzimas como poligalacturonase (Andrade et al., 2008) tem sido previamente verificada. Deste modo, o propósito deste trabalho foi de otimizar as concentrações de pectina e água de maceração de milho usados como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente no meio de cultivo, assim como o pH inicial na produção de poligalacturonase pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 e assim determinar o potencial desta bactéria termofílica usando a ferramenta do planejamento experimental.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

O microrganismo empregado neste estudo foi o *Bacillus* sp. SMIA-2, que foi previamente isolado do solo de Campos dos Goytacazes – RJ. Comparações com as sequências de 16s rRNA indicaram que o isolado possui 94% de similaridade com *B. caldoxylyticus* e *Bacillus* sp. espécie AK1 (Nunes e Martins, 2001).

2.2. Produção de poligalacturonase

O meio de cultivo usado para a produção de poligalacturonase continha (g/L de água destilada): KCl (0,3), MgSO₄ (0,5), K₂HPO₄ (0,87), CaCl₂ (0,29), ZnO ($2,03 \times 10^{-3}$), FeCl₃.6H₂O ($2,7 \times 10^{-2}$), MnCl₂.4H₂O ($1,0 \times 10^{-2}$), CuCl₂.2H₂O ($8,5 \times 10^{-5}$), CoCl₂.6H₂O ($2,4 \times 10^{-3}$), NiCl₃.6H₂O ($2,5 \times 10^{-4}$), e H₃BO₃ ($3,0 \times 10^{-4}$). As concentrações de pectina e água de maceração de milho no meio de cultivo e o

pH inicial foram variados de acordo com o delineamento experimental (Tabela 1). Meio de produção (25 mL) em um frasco Erlenmeyer de 250 ml foi inoculado com 5 mL de uma cultura preparada de véspera (pré-inóculo) e incubado a 50°C em um shaker orbital (Thermo Forma, Ohio, USA) operado a 150 rpm. Frascos triplicados, contendo 25mL de meio, foram retirados após 36 horas de fermentação e usados para determinar o crescimento celular por densidade ótica (DO 600nm). Os conteúdos foram centrifugados a 15.000 rpm a 4°C por 15 minutos e o sobrenadante livre de células usado como extrato bruto enzimático.

2.3. Análise de enzima

A atividade da poligalacturonase foi medida pela redução de determinada quantidade de grupos expressos como unidades de ácido galacturônico que foram liberados durante a incubação de 800 µl de 0,5% (v/v) pectina cítrica, preparada em 0,2 M borax-NaOH tampão, pH 10 com 200 µl da enzima a 60°C, por 10 minutos, pelo método de DNS (Miller, 1959). Uma unidade de poligalacturonase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido galacturônico por minuto a partir da pectina de maçã nas condições do ensaio.

2.4. Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados de acordo com um planejamento experimental completo 2^3 com três pontos centrais para avaliar o efeito da pectina (X_1), água de maceração de milho (X_2) e pH inicial (X_3) do meio de cultivo na produção de poligalacturonase (Tabela 1). A variável resposta “Y” foi a produção de poligalacturonase (U/mL) durante o processo de fermentação. Os dados experimentais foram analisados usando o programa “Statistica” software versão 5.0 (StatSoft Co.) e $P < 0.05$ foi adotado como critério de significância estatística. O programa “Design expert” versão 6.0.6 (Stat-Ease, Inc.) foi usado para realizar a análise de variância (ANOVA). A significância estatística dos coeficientes de regressão individuais e do modelo matemático foram determinados segundo teste “F” de Fischer e a proporção de variação explicada pelo modelo obtido foi estabelecida usando como critério os coeficientes de correlação (R^2). As

concentrações ótimas de cada variável independente foram obtidas por otimização numérica e gráfica usando o programa "Design expert".

Tabela 1. Matriz experimental segundo planejamento experimental completo 2^3 com três pontos centrais.

Variáveis	Código	Níveis		
		-1	0	+1
Concentração de pectina, %	X_1	0,3	0,65	1,0
Água de maceração de milho %	X_2	0,3	0,65	1,0
pH inicial do meio de cultura	X_3	6,0	8,0	10,0

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com os 11 testes realizados com o planejamento estatístico como mostra a Tabela 2. Os maiores valores de atividade da poligalacturonase foram atingidos na corrida 3, 9, 10 e 11.

Tabela 2. Produção de *Bacillus* sp. SMIA-2 depois de 36 horas de fermentação usando o planejamento experimental completo 2^3 com três pontos centrais.

N° exp.	<i>Variáveis independentes</i>			<i>Resposta da variável**</i>	
	X_1	X_2	X_3	Y (U/MI)	Y (D.O)
1	-1.00	-1.00	-1.00	62.23	1,209
2	1.00	-1.00	-1.00	35.75	0,281
3	-1.00	1.00	-1.00	159.53	1,258
4	1.00	1.00	-1.00	53.62	0,132
5	-1.00	-1.00	1.00	59.7	1,219
6	1.00	-1.00	1.00	37.75	0,859
7	-1.00	1.00	1.00	46.58	1,134
8	1.00	1.00	1.00	46.21	1,216
9*	0.00	0.00	0.00	102.42	1,256
10*	0.00	0.00	0.00	107.09	1,236
11*	0.00	0.00	0.00	103.17	1,238

* valores do ponto central

**Corresponde à média dos valores realizados em triplicata

No entanto, é claramente observável que a variabilidade de todos os fatores afetou significativamente a atividade da enzima (Figura 1). Deste modo, na Figura 1 a linha vertical do plano, mostra os efeitos que foram estatisticamente significantes. Particularmente, a concentração de pectina teve um maior efeito (negativo), cujo valor estimado foi de -21.8. Conseqüentemente, a produção de enzima foi significativamente reduzida pelo aumento da concentração de pectina. Além disto, os efeitos negativos de ambos, pH e concentração de pectina apontaram a importância de trabalhar com níveis baixos de ácido e indutor, respectivamente. Em despeito a estes resultados, a água de maceração de milho mostrou efeitos positivos, resultando em um crescimento linear na produção de enzimas quando seu conteúdo foi também aumentado ou quando o pH médio inicial e a concentração de pectina foram reduzidas. Comparativamente, Sharma e Satyanarayana (2006) estudaram a produção de pectinase pelo *Bacillus pumillus* usando a metodologia de superfície de resposta. De acordo com estes

autores, o pH foi o fator que mais influenciou a produção de pectinase. Fora isso, Malvessi e Silveira (2004) reportam altos valores de poligalacturonase usando pectina como indutor e concluíram que o crescimento da *Aspergillus oryzae* foi favorecido pelo pH próximo de 4, embora um valor de pH por volta de 3 foi necessário para a produção desta enzima. De acordo com o citado, observa-se que não existe um meio de cultura definido para a produção de pectinase, uma vez que cada microrganismo tem requerimentos físico-químicos e nutricionais particulares.

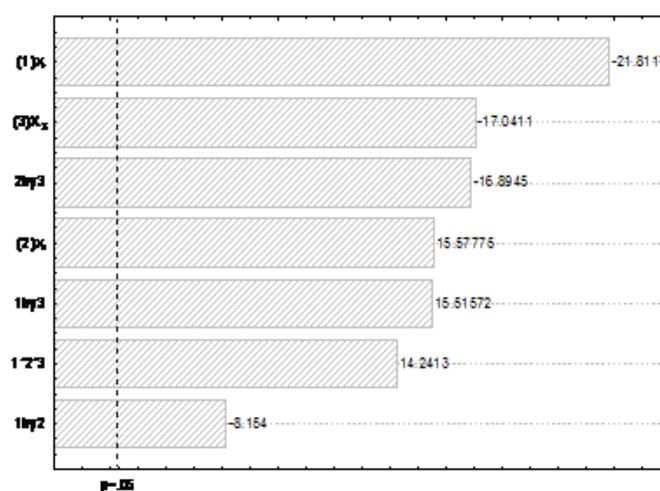


Figura. 1. Gráfico de Pareto ilustrando os efeitos referentes à produção de pectinase em nível de 95% de confiança.

Os dados experimentais foram ajustados de acordo com a equação polinomial de primeira ordem (Equação 1), usando o software “Design expert”. A análise da variação (ANOVA) indicou que todos os termos do modelo foram significantes (Tabela 3), desde valores de “ $Prob > F$ ” menores que 0,05 indicaram que os termos do modelo são significantes. De acordo com o modelo F-value (257,75) foi possível concluir que este modelo foi estatisticamente significativo desde que F calculado foi maior que o tabelado para o nível de significância escolhido.

$$Y = 62.67 - 19.34X_1 + 13.81X_2 - 15.11X_3 - 7.23X_1X_2 + 13.76X_1X_3 - 14.98X_2X_3 + 12.63X_1X_2X_3 \quad (1)$$

Tabela 3. Análise de variância (ANOVA) para o modelo estatístico com 95% de nível de confiança.

Fonte de variação	Produção de pectina (U/mL)			F_{cal}	Prob>F
	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática		
Modelo	11348,23	7	1621,18	257,75	0,0039
X ₁	2992,28	1	2992,28	475,75	0,0021
X ₂	1526,28	1	1526,28	242,67	0,0041
X ₃	1826,50	1	1826,50	290,40	0,0034
X ₁ X ₂	418,18	1	418,18	66,49	0,0147
X ₁ X ₃	1514,15	1	1514,15	240,74	0,0041
X ₂ X ₃	1795,20	1	1795,20	285,42	0,0035
X ₁ X ₂ X ₃	1275,63	1	1275,63	202,81	0,0049
Curvatura	3767,45	1	3767,45	598,99	0,0017
Erro puro	12,58	2	6,29		
Total	15128,26	10			

O valor da curvatura de 598,99 indicou que esta foi significativa em nível de confiança adotado, sugerindo que um outro modelo poderia ser avaliado. No entanto, o coeficiente de correlação múltiplo (R^2) foi 0,9989, sugerindo que 99,89% da variabilidade da resposta podem ser explicadas pelo modelo obtido. Conseqüentemente, resultados ANOVA confirmaram um ajuste satisfatório do modelo polinomial para o dado experimental.

Por outro lado, os resultados obtidos mostram que as condições de cultivo, isto é, substratos utilizados e pH, assim como, temperatura constante, não apenas afetou o crescimento microbiano mas também a secreção de poligalacturonase. O padrão de crescimento do *Bacillus* sp SMIA-2 e da produção de poligalacturonase foi observada por 48 horas em meio líquido com 0,5% de pectina e 0,3% de água de maceração de milho e pH inicial 7,5 em frasco erlenmeyer de 250 mL (Figura 2). *Bacillus* cresceu muito rápido e a formação de poligalacturonase começou a partir de 6 horas de incubação, alcançando um valor máximo de 39 U/mL com 36 horas de cultivo, posteriormente começaram a decair. Assim, a máxima atividade da poligalacturonase foi observada na fase estacionária, quando o crescimento do microrganismo já tinha cessado. Estes resultados sugerem que uma efetiva indução de poligalacturonase pode não

ocorrer enquanto a fase estacionária não seja alcançada e a fonte de carbono disponível esgotada.

Estudos similares foram realizados para produção de protease e α -amilase. Carvalho (2006) ao estudar a produção de amilase observou que o crescimento exponencial do microrganismo foi observado por um período de tempo relativamente curto, iniciando após 4 horas de crescimento e finalizando após 12 horas. A partir deste tempo, a cultura entrou na fase estacionária. Da mesma forma, de acordo com estudos realizados por Delatorre (2007), para produção de proteases foi alcançada após 16 horas de incubação do microrganismo, quando o crescimento já havia cessado e a cultura se encontrava na fase estacionária de crescimento. Resultados similares foram encontrados para a protease secretada pelo *Bacillus sphaericus* (Singh et al., 2003).

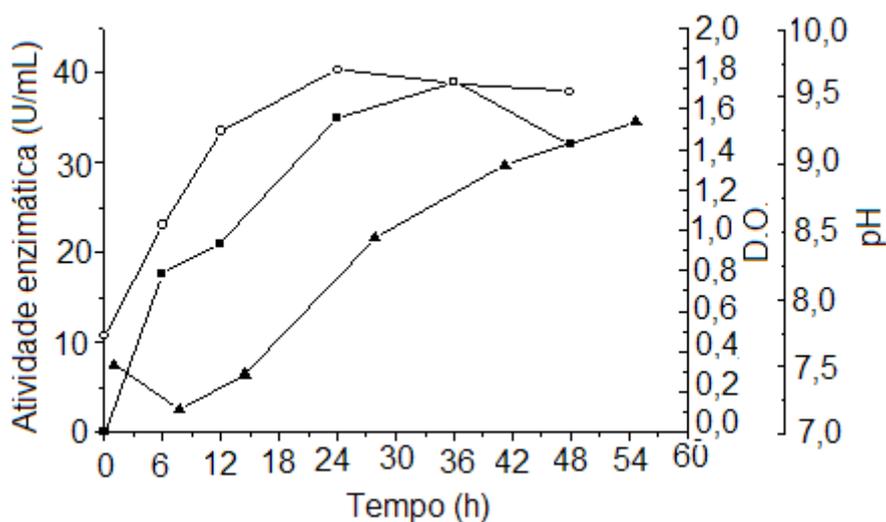


Figura 2. Crescimento e atividade de poligalacturonase de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em 0,5% de pectina cítrica e 0,5% de água de maceração de milho a 50°C e 150 rpm. Símbolos: (■) Atividade enzimática em U/mL; (○) Densidade Óptica a 600 nm e (▲) pH.

O crescimento e a atividade da poligalacturonase foram estudados em função do tempo de fermentação por Cordeiro e Martins (2009) e seus dados revelaram após o período de 30 horas de cultivo, enquanto que a concentração celular máxima foi alcançada com 24 horas de incubação.

Uma região de trabalho desejável foi obtida por otimização gráfica quando altos valores de atividade da poligalacturonase (>100 U/mL) foram alcançados (conforme mostrado na Figura 3). Esta porção gráfica sombreada, basicamente consistiu de uma região desejável de acordo com o critério imposto. Finalmente, novos experimentos foram realizados, procurando a validação do modelo estatístico, usando 0,3% pectina, 1,0% água de maceração de milho e pH inicial 6,0. Sob esta condição, os resultados previstos para a produção de poligalacturonase foram 159 U/mL e o novo valor experimental observado foi 153 U/mL, com somente 4% de diferença, aproximadamente de modo que a validade do modelo foi confirmada.

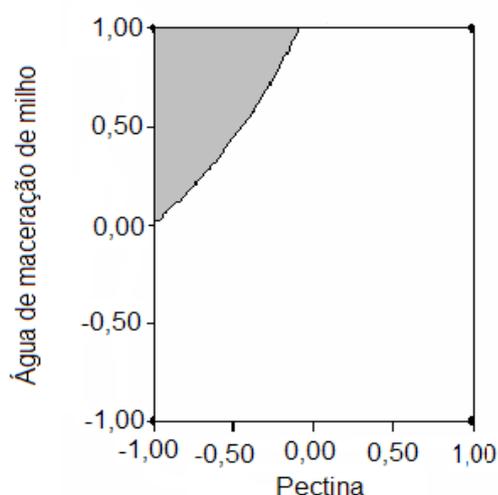


Figura 3. Otimização (método gráfico) da produção de pectinase pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 em função da concentração da água de maceração de milho e pectina (valor de pH codificado = -1).

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi demonstrado o uso do planejamento experimental estatístico para determinar as condições ótimas que conduzem a uma alta

produção de poligalactorunase usando *Bacillus* sp. SMIA-2, quando resíduos agroindustriais baratos como ingredientes do meio são empregados. A máxima produção de poligalactorunase foi alcançada usando 0,3% pectina, 1,0% água de maceração de milho e pH médio inicial de 6,0. Então, de acordo com as altas atividades obtidas, este é um processo atrativo que poderia ser futuramente implementado pela indústria visando à produção de poligalactorunase por fermentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali Z.M. e Brady C.J., (1982) Purification and characterization of the polygalacturonases of tomato fruits. *Aust J Plant Physiol* 9: 155-169.
- Andrade M.V.V., Delatorre A.B., Ladeira A.S., Côrrea T.L.R., Martins M.L.L., (2008) *In CD-ROM Full Text of the VIII ENZITEC/2008*, Rio de Janeiro, Brazil.
- Blanco P., Sieiro C., Villa T.G., (1999) Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 175: 1–9.
- Cao J., Sun W., Pan Y., Chen S., (2000) High-Producers of Polygalacturonase Selected From Mutants Resistant to Rifampin in Alkalophilic *Bacillus* sp. NTT33. *Enzyme MicrobTech* 27: 545–548.
- Carvalho R.V, Côrrea T.L.R., Silva J.C.M.; Mansur L.R.C.O., Martins M.L.L., (2008) Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol* 39:102-107.
- Celestino S.M.C., Freitas S.M., Medranoc F.J., Sousa M.V., Filho E.X.F., (2006) Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. *J Biotechnol* 123: 33–42.
- Cordeiro, C.A.M.; Martins, M.L.L. (2009) Produção de poligalactorunase, pelo termofílico *Bacillus* sp., e algumas de suas propriedades. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 29(1): 1-7.
- Dinu D., Nechifor M.T., Stoian G., Costache M., Dinischiotu A., (2007) Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus Níger* MIUG 16 *J Biotechnol* 131: 128–137.

- Gupta S., Kapoor M., Sharma K.K., Nair L.M., Kuhad C.R., (2007) Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach. *Biores Technol* 99: 937–945.
- Jacob N., Prema P., (2006) Influence of mode of fermentation on polygalacturonase production by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technol Biotechnol* 44: 263–267.
- Jayani R.S., Saxena S., Gupta R., (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Proc Biochem* 40: 2931–2944.
- Kaur G., Kumar S., Satyanarayana T., (2004) Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. *Biores Technol* 94: 239–243.
- Malvessi E., Silveira M.M., (2004) Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Braz Arch Biol Techn* 47: 693-702.
- Miller G.L., (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 3: 426-428.
- Nascimento W.C.A., Martins M.L.L. (2006) Studies on the stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent. *Braz J Microbiol* 37: 307-311.
- Nunes A.S., Martins M.L.L., (2001) Isolation properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Braz J Microbiol* 32: 271-275.
- Ortega N., de Diego S., Perez-Mateos M., Busto M.D., (2004) Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chem* 88: 209– 21.
- Phutela U., Dhuna V., Sandhu S., Chadha B.S., Braz J., (2005) Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Microbiol* 36: 63.
- Sharma D.C., Satyanarayana T., (2006) A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Biores Technol* 97: 727–733.
- Silva C.R., Delatorre A.B., Martins M.L.L., (2007) Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity. *Braz J Microbiol* 38: 253-258.
- Singh, J.; Batra, N.; Sobti, C.R. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process. Biochemistry*, 36:781-785, 2001.

- Soares M.M.C.N., da Silva R., Gomes E., (1999) Screening of bacterial strains or pectinolytic activity : characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 30: 299-303
- Ustok F.I., Tari C., Gogus N., (2007) Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *J Biotechnol* 127:322-334.

3.3. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE POLIGALACTURONASES PELO TERMOFÍLICO *Bacillus* sp. SMIA-2

Marcela Vicente Vieira Andrade, Andréia Boechat Delatorre, Silvania Alves
Ladeira, Victor Haber Perez, Meire Lelis Leal Martins*

Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte
Fluminense (UENF). Av. Alberto Lamego, 2000, Pq. Califórnia, Campos dos
Goytacazes, RJ-Brasil, 28013-602.

RESUMO

A produção de poligalacturonases pelo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo pectina e água de maceração de milho foi estudada. Além disso, algumas propriedades da enzima foram determinadas. O enriquecimento do meio de cultura contendo 0,65% de pectina como fonte de carbono, com 0,65% de água de maceração de milho aumentou substancialmente a atividade da poligalacturonase. Nestas condições a máxima atividade da enzima foi alcançada após 36 horas com níveis de 150,3 U/mL. Estudos sobre a caracterização da poligalacturonase revelaram que a enzima aumenta a sua atividade a temperaturas entre 40°C e 70°C, onde a enzima alcança sua máxima

atividade. Acima de 70°C, ocorreu uma redução na atividade da enzima e a 80° C a poligalacturonase perdeu em torno de 80% de sua atividade. Em relação à estabilidade térmica da poligalacturonase foi observado que a enzima reduziu sua estabilidade a temperaturas acima de 70°C. O pH ótimo da poligalacturonase foi 10,0. A valores de pH maiores que 10,0 a atividade da enzima decresceu e a pH 11,0 a atividade foi reduzida para 30%. A estabilidade da enzima aumentou com o aumento do pH até 9,5. Em valores de pH acima de 9,5 a atividade da poligalacturonase diminuiu.

Palavras-chave: Poligalacturonase; *Bacillus* sp; água de maceração de milho.

ABSTRACT

PRODUCTION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF POLYGALACTURONASES BY THERMOPHILIC *Bacillus* sp. SMIA-2

Marcela Vicente Vieira Andrade, Andréia Boechat Delatorre, Sylvania Alves
Ladeira, Victor Haber Perez*, Meire Lelis Leal Martins*

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (*UENF*), *Center of the Science and Farming Technologies (CCTA), Food Technology Laboratory (LTA)-Brazil*

The production of polygalacturonase by the thermophilic *Bacillus* sp SMIA-2 cultivated in a liquid medium containing pectin and corn steep liquor was studied. In addition, some properties of the enzyme were determined. The enrichment of the culture medium containing 0.65% pectin as carbon source, with 0.65% corn steep liquor improved substantially the polygalacturonase activity. In these conditions the maximum activity of the enzyme was reached after 36h with levels of 150.3U/mL. Studies on the polygalacturonase characterization revealed that the enzyme increased the activity at temperatures between 40°C and 70°C, where the

activity reached its maximum. Above 70°C occurred a reduction in the activity of the enzyme and at 80 °C the polygalacturonase lost about 80% of its activity. Regarding the thermal stability of polygalacturonase was observed that this enzyme reduced its stability at temperatures higher than 70°C. The optimum pH of polygalacturonase was found to be 10.0. At values of pH higher than 10.0 the activity of the enzyme decreased and at pH 11.0 the activity was reduced in 30%. The stability of the enzyme increased with the increase of pH until 9.5. In values of pH above 9.5 the polygalacturonase activity decreased.

Key-words: Polygalacturonases; Corn steep liquor; *Bacillus* sp.

1. INTRODUÇÃO

Pectinase é um nome genérico para a família de enzimas que atacam e despolimerizam a pectina por hidrólise e transeliminção. A ligação éster existente entre os grupos carboxílico e metílico da pectina são hidrolisados através da reação de desesterificação (Uenojo e Pastore, 2007). Dentre as pectinases incluem a poligalacturonase (EC 3.2.1.15), pectina esterase (EC 3.1.1.11), pectina liase (EC 4.2.2.10) e pectato liase (EC 4.2.2.2), classificadas de acordo com sua atuação (Alkorta et al. 1998; Hoondal et al. 2002; Kapoor e Kuhad 2002).

Pectinases são amplamente utilizadas na indústria. Dentre suas diferentes aplicações, destaca-se especialmente a indústria de alimentos, onde são utilizadas na clarificação de vinhos e sucos de fruta, além de atuar na maceração de vegetais para facilitar a extração de óleos e pigmentos (Gupta et al. 2007).

Poligalacturonase (E.C. 3.2.1.15), de fonte microbiana, é a mais importante pectinase utilizada nas indústrias. A termoestabilidade destas enzimas é de grande importância na pasteurização de sucos de frutas, já que o processo ocorre em temperaturas elevadas que variam entre 50–60°C (El-Sheekh et al. 2008). Embora um grande número de organismos produtores de pectinases foi relatado, esta seleção é uma tarefa difícil, especialmente porque é essencial a obtenção de

espécies fisiologicamente adaptadas para produzir altos níveis da enzima (Sharma e Satyanarayana 2006).

Bactérias pertencentes ao grupo *Bacillus* sp. constituem a fonte mais importante de enzimas microbianas comerciais (Asgher et al. 2007). Isto é devido ao fato destes organismos serem capazes de crescer sob condições extremas de temperatura e pH e originar produtos que se tornam estáveis em uma ampla faixa de ambientes (Wang et al. 2007). A maior parte das bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. apresenta uma variedade de sistemas de enzimas hidrolíticas e são capazes de utilizar substâncias orgânicas consistindo de misturas complexas típicas de resíduos. Além disso, com exceção do grupo *Bacillus cereus* (que inclui o *Bacillus anthracis*), são saprófitas inofensivos que não produzem toxinas e são incluídos no grupo de organismos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (Mahmood et al. 1998).

No presente trabalho é relatado a produção de uma poligalacturonase alcalina pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2, cultivado em meio contendo pectina de maçã e enriquecido com a água de maceração de milho. Além disso, algumas propriedades da enzima secretada nestas condições foram determinadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo e condições da cultura

O microrganismo utilizado neste estudo foi uma bactéria termofílica, *Bacillus* sp. SMIA-2, isolada de amostras de solo coletado na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil (Nunes e Martins, 2001).

Para a produção enzimática, o seguinte meio de cultivo foi usado (g/L de água destilada): pectina de maçã 5,0 ou 6,5; água de maceração de milho 3,0 ou 6,5; KCl 0,3; MgSO₄ 0,5; K₂HPO₄ 0,87; CaCl₂ 0,29; ZnO-2,03x10⁻³; FeCl₃.6H₂O-2,7x10⁻²; MnCl₂.4H₂O-1,0x10⁻²; CuCl₂.2H₂O-8,5x10⁻⁵; CoCl₂.6H₂O-2,4x10⁻³; NiCl₃.6H₂O-2,5x10⁻⁴ e H₃BO₃-3,0x10⁻⁴. O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH e este meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. O meio foi inoculado com 0,5 mL de uma cultura de véspera e incubado a 50°C em um shaker orbital (Thermo Forma, Ohio, USA) operado a 150 rpm. Em todos os

experimentos foram realizadas três repetições, sendo cada uma constituída por 25 mL de meio de cultura em erlenmeyer de 250 mL. A intervalos de tempo determinados foram retirados frascos para medida da densidade ótica a 600nm, com a utilização de um espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, pH e dosagem da atividade da enzima nos filtrados da cultura.

2.2. Análise enzimática

Para a remoção das células, o meio de cultura foi centrifugado a 4500 rpm por 15 minutos a 4°C em uma centrífuga modelo Hermle Z 382 e o sobrenadante livre de células utilizado para dosagem da atividade da enzima.

A atividade da poligalacturonase foi medida quantificando os grupos redutores expressos como unidades de ácido galacturônico liberados durante a incubação de 800 μ l de 0,5% (p/v) de pectina cítrica, preparada em 0,2 M tampão Borax-NaOH, pH 10 com 200 μ l da enzima a 70°C, por 10 minutos, pelo método DNS (Miller, 1959). Uma unidade da atividade foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir 1 μ mol de ácido galacturônico a partir da pectina em 1 minuto a 70°C. A proteína foi medida pelo método de Petterson (Peterson, 1977).

2.3. Efeito do pH na atividade e estabilidade da poligalacturonase

O pH ótimo para a atividade da poligalacturonase foi determinado com pectina cítrica 0,5% (p/v) como substrato, dissolvida em diferentes tampões: fosfato de sódio (pH 6,0-7,5), Tris/HCl (pH 8,0-9,0) e Borax-NaOH (9,5-10). Os valores de pH das misturas foram ajustados com seus respectivos tampões.

A estabilidade da poligalacturonase a diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se o extrato enzimático nos tampões anteriormente descritos, sem o substrato, por 2 horas à temperatura ambiente. Após este tratamento, a atividade residual da poligalacturonase foi determinada conforme descrito anteriormente no item 2.2.

2.4. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da poligalacturonase

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado incubando-se a mistura de reação em temperaturas que variaram de 40°C - 100°C por 10 minutos em pH 10,0. Depois de 10 minutos de incubação em cada temperatura a atividade enzimática foi analisada.

A estabilidade térmica foi avaliada incubando-se a enzima em temperaturas que variaram de 40°C a 100°C, com intervalos de 10°C. Após duas horas de incubação, a atividade residual foi analisada à temperatura ótima da enzima, determinada anteriormente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Produção enzimática

Bacillus sp. SMIA-2 quando cultivado em meio líquido contendo pectina de maçã (0,5%) como fonte de carbono e suplementado com água de maceração de milho (0,3%), produziu poligalacturonases (Figura 1). A produção máxima da enzima (39 U/mL) ocorreu após o microrganismo atingir seu crescimento máximo, sugerindo que o mesmo pode ser sensível à repressão metabólica. A indução efetiva da poligalacturonase pode não ocorrer até que a fase estacionária tenha sido alcançada e as fontes de carbono disponíveis esgotadas.

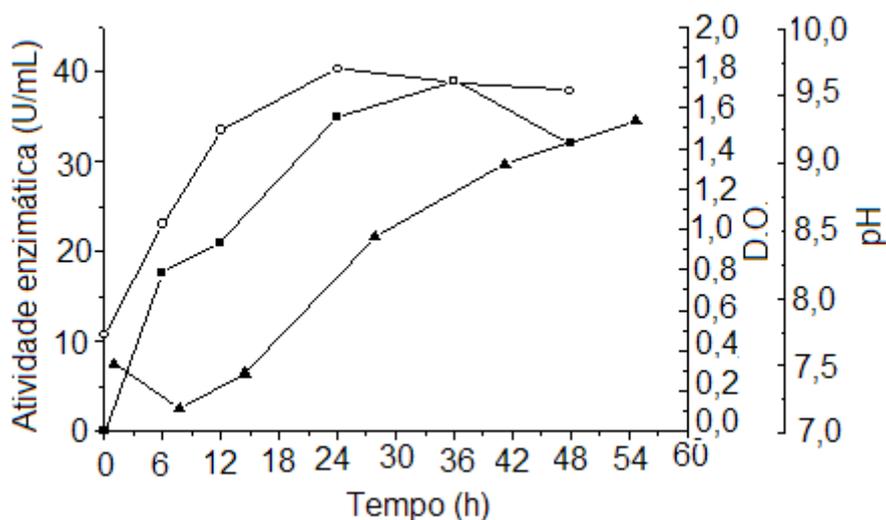


Figura 1. Crescimento e atividade de poligalacturonase de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado em 0,5% de pectina cítrica e 0,5% de água de maceração de milho a 50°C e 150 rpm. Símbolos: (■) Atividade enzimática em U/mL; (○) Densidade Óptica a 600 nm e (▲) pH.

Bacillus sp. MG-cp-2 crescendo em meio mínimo suplementado com 1% de pectina de maçã como única fonte de carbono, alcançou a máxima atividade da poligalacturonase (47 U/mL), quando a população da célula atingiu o seu pico. Entretanto, quando o meio foi enriquecido com 0,5% de extrato de levedura, a máxima produção foi de 98 U/mL, depois de 20 horas de incubação da cultura (Kapoor et al., 2001). De fato, a produção de enzimas por várias espécies, incluindo o grupo *Bacillus*, é melhorada quando se aumenta a disponibilidade de nitrogênio no meio de cultura pela adição de, geralmente, extrato de levedura ou peptona (Silva et al. 2007).

As concentrações de pectina de maçã e água de maceração de milho no meio foram aumentadas de 0,5% e 0,3%, respectivamente para 0,65%. Esta modificação do meio não afetou o crescimento do microrganismo, mas promoveu um aumento de cinco vezes na atividade da poligalacturonase, que alcançou níveis de 150,3 U/mL (Figura 2).

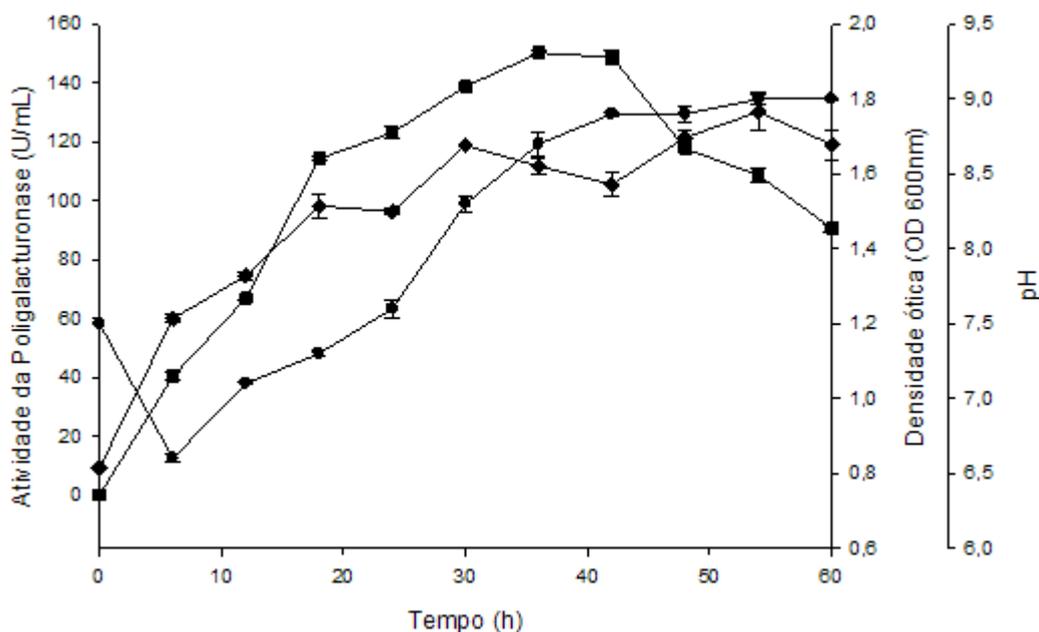


Figura 2. Curva meio com água de maceração de milho (■) atividade da poligalacturonase; (●) pH; (◆) crescimento da poligalacturonase produzida pelo *Bacillus* sp. crescido em meio contendo 0,65% pectina, 0,65% água de maceração de milho em 50°C, e pH inicial de 8,0.

Estes resultados são similares aos encontrados para o *Penicillium* SPC-F 20 em que um aumento na concentração de pectina no meio de cultura resultou em um aumento da produção de poligalacturonase pelo organismo. Os níveis mais altos da enzima foram alcançados quando a concentração desta fonte de carbono foi de 1% (Mathew et al. 2008).

Rivas et al., (2004) mostraram em seu trabalho que a utilização da água de maceração de milho, um subproduto da indústria de processamento de amido, juntamente com a pectina é uma escolha atraente para a produção de poligalacturonases pelo *Bacillus* sp SMIA-2, uma vez que é uma fonte de nutrientes relativamente barata. Além de beneficiar o meio de crescimento pelo fornecimento de fonte de nitrogênio, este resíduo fornece vários micronutrientes, vitaminas e fatores estimulantes do crescimento microbiano (Kumar e Takagi 1999).

A atividade da poligalacturonase aumentou ligeiramente com a elevação da temperatura, atingindo seu valor máximo entre 60°C e 70°C, conforme mostrado

na Figura 3. Na temperatura de 80° C a enzima apresentou em torno de 37% de sua atividade máxima.

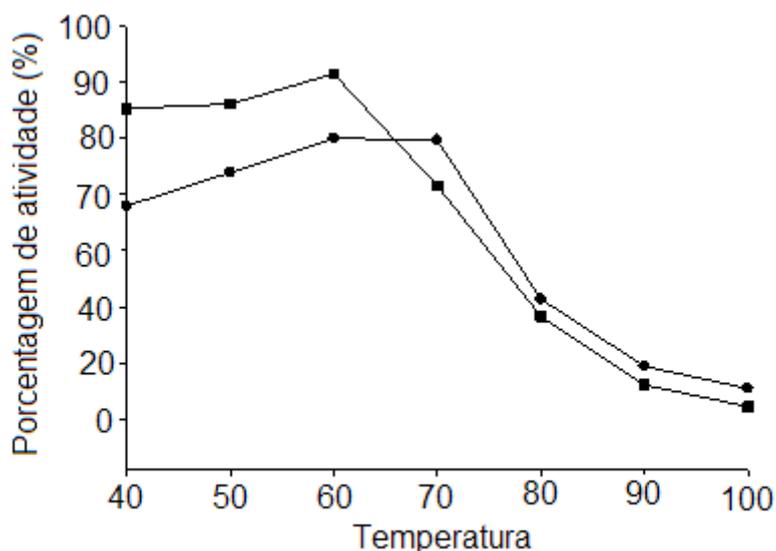


Figura 3. (●) Temperatura ótima e (■) estabilidade da poligalacturonase produzida pelo *Bacillus* sp. crescido em meio contendo 0,65% pectina e 0,65% de água de maceração de milho a 50°C, pH inicial de 8,0 por 36 horas. 100% da atividade enzimática = 242,2 U/mg de proteína.

Temperaturas ótimas de 60°C foram relatadas para pectinases de *Bacillus* sp. MG-cp-2 (Kapoor et al., 2002) e *Streptomyces* sp. QG-11-3 (Beg et al., 2001), enquanto que temperaturas ótimas mais baixas entre 45°C e 50°C foram relatadas para pectinases de *Sclerotinia sclerotiorum* (Riou et al., 1992) e *Saccharomyces cerevisiae* (Blanco et al., 1998), respectivamente.

A utilização de enzimas termoestáveis como a poligalacturonase em diversos processos industriais é vantajosa, porque altas temperaturas podem ser empregadas no processo, com a conseqüente redução do risco de contaminação microbiana, a maior parte dos reagentes torna-se mais solúvel difundindo-se mais rapidamente e assim permitindo que concentrações maiores destes compostos possam ser usadas, aumento da taxa de transferência e aumento da solubilidade dos substratos, etc (Wang et al., 2007).

Além da temperatura ótima, a termoestabilidade da poligalacturonase foi examinada pela medida da atividade residual a 60°C, depois da incubação da enzima a temperaturas entre 40°C e 100°C por 2 horas (Figura 3). Observou-se que a enzima foi termoestável e reteve cerca de 83% de sua atividade à 70° C depois de 2 horas de incubação. A termoestabilidade da enzima investigada é compatível favoravelmente com aquelas reportadas para o gênero *Bacillus* sp.(Kuhad et al. 2004).

A poligalacturonase exibiu atividade ótima a pH 10 (Figura 4). A enzima foi mais estável na faixa de pH entre 8,0 e 10,0, sendo que mais de 71% e 75% de sua atividade foram retidas nestes valores, respectivamente (Figura 5). Diante destes resultados acredita-se que a poligalacturonase de *Bacillus* sp SMIA-2 possa encontrar muitos usos industriais.

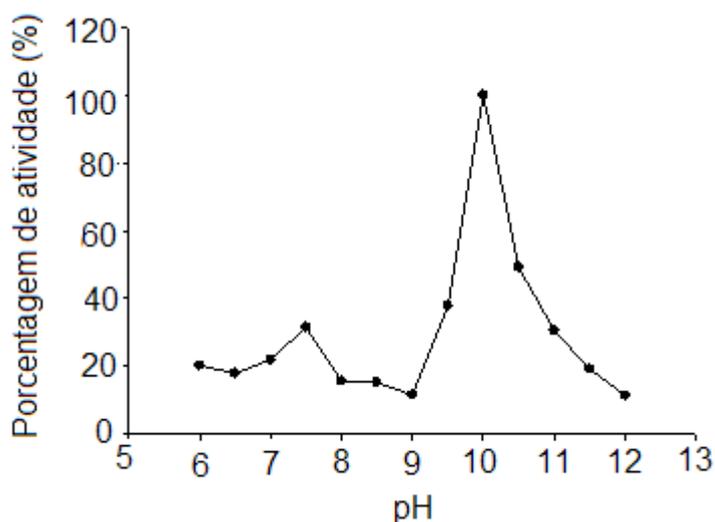


Figura 4. (■) pH ótimo da produção de poligalacturonase pelo *Bacillus* sp crescido em meio contendo 0,65% pectina, 0,65% de água de maceração de milho a 50°C, pH inicial de 8,0 por 36 horas. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem máxima (100% da atividade enzimática = 266,5 U/mg de proteína/galacturônico/min/mL).

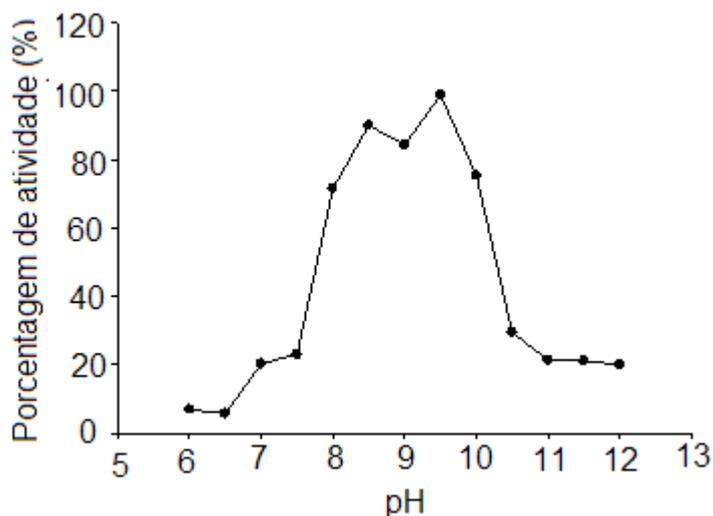


Figura 5. (●) estabilidade relativa da produção de poligalacturonase pelo *Bacillus* sp crescido em meio contendo 0,65% pectina, 0,65% de água de maceração de milho a 50°C, pH inicial de 8,0 por 36 horas. Atividade relativa é expressa como uma porcentagem máxima (100% da atividade enzimática = 426,4 U/mg de proteína/galacturônico/min/mL).

Pectinases com pH ótimo alcalino foram reportadas para o *Bacillus* NT-2, NT-6, NT-33 e NT-82 (Cao et al. 1992), *Bacillus* sp. MG-cp-2 (Kapoor et al. 2001), e *Bacillus* sp. KSM-P15 (Kobayashi et al. 1999).

Soares, Silva e Gomes (1999) investigaram o efeito do pH na atividade de poligalacturonase de várias estirpes de *Bacillus* sp cultivado em fermentação semi-sólida. De acordo com estes autores a maioria das estirpes estudadas apresentou pH ótimo para atividade de poligalacturonase de 6,0. Apenas o *Bacillus* P4.3 apresentou pH ótimo entre 6,5 e 7,0.

Kapoor, Beg, Bhushan, Dadhich e Hoondal (2000) estudando a poligalacturonase produzida por *Bacillus* sp. MG-cp-2, observaram que a mesma foi otimamente ativa em pH 10,0 e manteve mais de 86% de sua atividade em uma faixa de pH 8,5-12,0 a 60 °C. De acordo com Lehninger, Nelson e Cox (1995), o pH ótimo para a atividade de uma enzima reflete, em geral, o ambiente em que a mesma é normalmente encontrada.

4. CONCLUSÃO

A utilização da água de maceração de milho como nutriente no meio de cultura contendo pectina, foi eficaz para a produção de poligalacturonases pelo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2.

A temperatura e o pH ótimo para a atividade da poligalacturonase foram 60°C e 10,0, respectivamente. A enzima apresentou boa estabilidade térmica e a valores alcalinos de pH, sendo portanto, promissora para aplicação em processos industriais onde esta condição é necessária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkorta, I., Garbisu, C., Liama, M.J. e Serra, J.L. (1998) Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry* 33, 21–28.
- Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U., Legge, R.L. (2007) A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79: 950-955.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Tiwari, R.P., Hoondal, G.S. (2001) Bleach-boosting of eucalyptus kraft pulp using combination of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Res Bull Panjab University* 57: 71–8.
- Blanco, P., Sieiro, C., Reboredo, N.M. e Villa, T.G. (1998) Cloning, molecular characterization, and expression of an endopolygalacturonase- encoding gene from *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b. *FEMS Microbiol. Lett.* 164, 249–255.
- Cao, J., Zheng, L. e Chen, S. (1992) Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie. *Enzyme and Microbial Technology* 14, 1013– 1016.
- El-Sheekh, M.M., Ismail, A.S., El-Abd, M.A., Hegazy, E.M., El-Diwany, A. I. (2008) Effective technological pectinases by *Aspergillus carneus* NRC1 utilizing the Egyptian orange juice industry scraps. *International Biodeterioration & Biodegradation* 1–7.

- Gupta, S. Kapoor, M. Sharma, K.K., Nair, L.M., Kuhad, C.R, (2007) Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach. *Biores Technol* 99: 937–945.
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N. e Beg, Q.K. (2002) Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 409–418.
- Kapoor, M., Beg, Q. K., Bhushan, B., Dadhich, K. S., Hoondal, G. S. (2000). Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. *Process Biochemistry*, 36: p. 467-473.
- Kapoor, M., Beg, Q.K., Bhushan, B., Singh, K., Dadhich, K.S., Hoondal, G.S. (2001) Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast .bres. *Proc. Biochem.* 36, 803–807.
- Kapoor, M. e Kuhad, R.C. (2002) Improved polygalacturonase production from *Bacillus* sp. MG-cp-2 under submerged (SmF) and solid state (SSF) fermentation. *Letters in Applied Microbiology* 34, 317–322.
- Kobayashi, T., Sawada, K., Sumitomo, N., Hatada, Y., Nagahara, H. e Ito, S. (2003) Bifunctional pectinolytic enzyme with separate pectate lyase and pectin methylesterase domains from an alkalophilic *Bacillus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 269–277.
- Kuhad, R.C., Kapoor, M. e Rustagi, R., (2004) Enhanced production of an alkaline pectinase from *Streptomyces* sp. RCK-SC by whole-cell immobilization and solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 257–263.
- Kumar, C.G.; Takagi, H. (1999). Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, v. 17, p. 561-594.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. (1995). *Princípios de bioquímica*. 2 ed. São Paulo: SARVIER, 839p.
- Mahmood, A.U.; Greenman, J.; Scragg, A.H. (1998) Orange and potato pell extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme Microbial Technol.* 22, 130-137.
- Martin, N., Gueza, M., Leitea, R., da Silva, R., Gomes, E. (2007) Study of pectinase produced by thermophilic fungi *Rhizomucor* sp. N31 in FES. *Journal of Biotechnology* 131, 158.

- Mathew, A., Eldo, A.N., Molly, A.G.; (2008) Optimization of culture conditions for the production of thermostable polygalacturonase by *Penicillium* SPC-F 20; J Ind Microbiol Biotechnol 35:1001–1005.
- Rivas, B.; Moldes, A.B.; Dominguez, J.M.; Parajó, J.C. (2004) Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep licor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. International Journal of Food Microbiology, v. 97, p. 93 - 98.
- Silva, C.R, Delatorre, A.B., Martins, M.L.L., (2007) Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity. Braz J Microbiol 38: 253-258.
- Soares, M. M. C. N., Silva, R. Gomes, E. (1999). Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterizations of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 30: p. 299-303.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

O *Bacillus sp.* SMIA-2 mostrou a sua capacidade de produzir poligalacturonase em fermentação submersa. O meio de cultura quando suplementada com 0,5% de pectina de maçã juntamente com 0,5% de água de maceração de milho proporcionou maiores níveis desta enzima de acordo com os valores de atividade enzimática observados.

O design estatístico, foi usado como ferramenta, para determinar as condições de cultivo para a uma alta produção de poligalacturonase usando resíduos agroindustriais baratos como ingredientes do meio. A máxima produção de poligalacturonase foi alcançada pelo emprego de 0.3% pectina, 1.0% água de maceração de milho e pH médio inicial de 6.0.

A poligalacturonase secretada pelo microrganismo em estudo, apresentou atividade máxima em pH 10,0. Em relação à estabilidade ao pH, a poligalacturonase manteve 71% e 75% de sua atividade em pH 8,0 e 10,0 respectivamente, por 2 horas de incubação à temperatura ambiente.

A temperatura ótima encontrada para atividade da poligalacturonase foi de 60°C, sendo que a mesma foi estável a temperaturas de 70°C por 2 horas, mantendo 83% de sua atividade inicial.

De acordo com os estudos realizados neste trabalho os níveis de produção da poligalacturonase e sua alta estabilidade fazem com que a produção desta enzima se torne um processo atrativo para futuras implementações em escala industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, A., (1996) Extremophile research in the European Union: From fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiology Reviews*, 18: 89-92.
- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., Serra, J. L. (1998) Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, Oxford, v. 33, n. 1, p. 21-28.
- Ali ZM and Brady CJ, (1982) Purification and characterization of the polygalacturonases of tomato fruits. *Aust J Plant Physiol* 9: 155-169
- Andrade, C. M. M. C., Pereira-Jr., N., Antranikian, G. (1999) Extremely thermophilic microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, 30:287-298.
- Andrade MVV Delatorre AB Ladeira SA Côrrea TLR Martins MLL. (2008) Caracterização de poligalacturonases de culturas de *Bacillus* sp. SMIA-2 suplementadas com água de maceração de milho Resumos do VIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (ENZITEC), Rio de Janeiro, Brasil.
- Archana, A., Satyanarayana, T. (1997). Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 12-17.
- Asgher, M., Asad, M.J., Rahman, S.U., Legge, R.L. (2007) A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79:950-955.

- Atomi; H. (2005). Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 9: 166-173.
- Bacarat, M. C., Valentin, C., Muchovej, J. J., Silva, D. O. (1989) Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. *Biotechnology Letters*, Oxford, v. 11, p. 899-902.
- Bailey, M. J., Pessa, E. (1990) Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microbial Technology*, Worburn, v. 12, n. 4, p. 266-271.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Tiwari, R.P., Hoondal, G.S. (2001) Bleach-boosting of eucalyptus kraft pulp using combination of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *Res Bull Panjab University* 57: 71–8.
- Bertoldo, C., Antranikian, G. (2002) Starch hydrolyzing enzymes from thermophilic archae and bacteria. *Curr Opin Chem Biol*, 6:151–160.
- Bhat, M. K. (2000) Cellulases related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, v. 18, 355-383.
- Blanco P., Sieiro C., Villa T.G., (1999) Production of pectic enzymes in yeasts. *Fems Microbiol Lett* 175: 1–9.
- Blanco, P., Sieiro, C., Reboredo, N.M., Villa, T.G. (1998) Cloning, molecular characterization, and expression of an endopolygalacturonase- encoding gene from *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b. *FEMS Microbiol. Lett.* 164, 249–255.
- Bravo, C. E. C., Carvalho, E. P., Schwan, R. F., Gómez, R. J. H. C., Pilon, L. (2000) Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 24, edição especial, p. 137-152.
- Bruins, M. E., Janssen, A. E., Boom, R. M. (2001). Thermozyms and their applications: a review of recent literature and patents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 90: 155-186.
- Brumano, M. H. N., Coelho, J. L. C., Araújo, E. F. (1993) Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions. *World Journal Microbiology Biotechnology*, London, v. 9, n. 2, p. 225-228.
- Carvalho,R.V.(2007) Produção e caracterização de α -amilase por *Bacillus* sp. SMIA-2 termofilico utilizando proteínas do soro de leite, e algumas aplicações da enzima.Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 95p.

- Cao, J. M., Zheng, L. S., Chen, S.Y. (1992) Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie. *Enzyme Microbiology Technology*, Woburn, v. 14, n. 12, p. 1013-1016.
- Cao J, Sun W, Pan Y, Chen S, (2000) High-Producers of Polygalacturonase Selected From Mutants Resistant to Rifampin in Alkalophilic *Bacillus* sp. NTT33. *Enzyme Microb Tech* 27: 545–548.
- Carvalho RV, Côrrea TLRC, Silva JCM; Mansur LRCO, Martins MLL, (2008) Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol* 39:102-107.
- Celestino, S. M. C., Freitas, S. M., Medrano, F. J., Souza, M. V., Filho, E. X. F. (2006) Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 33-42.
- Contreras-Esquivel, C.J.C., Voget, C.E. (2004) Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. *Journal of Biotechnology*, v. 110, p.21–26.
- Cordeiro, C.A.M.; Martins, M.L.L. (2009) Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus* sp., e algumas de suas propriedades. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 29(1): 1-7.
- Delatorre, A. B. (2007) Utilização de resíduos agroindustriais par a produção de protease pelo microrganismo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2. Monografia - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ,34p.
- Dinu D, Nechifor MT, Stoian G, Costache M, Dinischiotu A, (2007) Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *J Biotechnol* 131: 128–137.
- El-Sheekh, M.M., Ismail, A.S., El-Abd, M.A., Hegazy, E.M., El-Diwany, A. I. (2008) Effective technological pectinases by *Aspergillus carneus* NRC1 utilizing the Egyptian orange juice industry scraps. *International Biodeterioration & Biodegradation* 1–7.
- Ferrer, M., Golyshina, O., Beloqui, A., Golyshin, P.N. (2007). Mining enzymes from extreme environments. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 207-214.
- Fomenkova, N. P., Nevskaya, N. A., Nikulin, A. D., Nikonov, S. V. (1998). Structural aspects of protein thermostability. *Molecular Biology*, 32: 265-272.
- Gainvors, A., Frézier, V., Lemaesquier, H., Lequart, C., Aigle, M., Belarbi, A. (1994) Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast*, v. 10, n. 10, 1311-1319.

- Garzón, C. G., Hours, R. A. (1992) Citrus waste: An alternative substrate for pectinase production in solid state culture. *Bioresource Technology*, Oxford, v. 39, n. 1, p. 93-95.
- Geocze, M. L. A. (1994) Efeitos de extrato de levedura, pH e outros fatores sobre a poligalacturonase de *penicillium expansum*. (dissertação mestrado em microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 54 p
- Gomes, E., Guez, M.A.U., Martins, N., da Silva, R. (2007). Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 1, 136-145.
- Gummadi, S. N., Panda, T. (2003) Purification and biochemical properties of microbial pectinases- a review. *Process Biochemistry*, Oxford, v. 38, n.7, p. 987-996.
- Gupta S, Kapoor M, Sharma KK, Nair LM, Kuhad CR, (2007) Production and recovery of an alkaline exo-polygalacturonase from *Bacillus subtilis* RCK under solid-state fermentation using statistical approach. *Biores Technol* 99: 937–945.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89: 17-34.
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N., Beg, Q.K. (2002) Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 409–418.
- Jacob, N., Prema, N. (2006) Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *Streptomyces lydicus*. *Food Technol Biotechnol* 44:263–267.
- Jayani R.S., Saxena S., Gupta R., (2005) Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Proc Biochem* 40: 2931–2944.
- Kapoor, M., Beg, Q.K., Bhushan, B., Singh, K., Dadhich, K.S., Hoondal, G.S. (2001) Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast .*Proc. Biochem.* 36, 803–807.
- Kapoor, M., Kuhad, R.C. (2002) Improved polygalacturonase production from *Bacillus* sp. MG-cp-2 under submerged (SmF) and solid state (SSF) fermentation. *Letters in Applied Microbiology* 34, 317–322.
- Karam, N. E.; Belarbi, A. (1995) Detection of polygalacturonases and pectin esterases in lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 11, 559- 563.

- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., Tewari, R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, Oxford, v. 77, n. 3, p. 215-227.
- Kashyap, D. R., Chandra, S., Kaul, A., Tewari, R. (2000) Production, purification and characterization of pectinase from *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 16, n. 3, 277-282.
- Kaur, G., Kumar, S., Satyanarayana, T., (2004). Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. *Biores. Technol.* 94, 239–243.
- Kobayashi, T., Sawada, K., Sumitomo, N., Hatada, Y., Nagahara, H., Ito, S. (2003) Bifunctional pectinolytic enzyme with separate pectate lyase and pectin methylesterase domains from an alkalophilic *Bacillus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 269–277.
- Kuhad, R.C., KAPOOR, M., Rustagi, R., (2004) Enhanced production of an alkaline pectinase from *Streptomyces* sp. RCK-SC by whole-cell immobilization and solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20: 257–263.
- Kumar, C.G., Takagi, H. (1999) Research review paper Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv.* 17:561-594.
- Lee, D. W., kim, H. W., Lee, K.W, Kim, B. C., Choe, E. A., Lee, H.S., Kim, D. S., Pyun, Y. R. (2001) Purification and characterization of two thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*, 29:363-371.
- Lévêque, E., Janecek, S., Hays, B., Belarbi, A. (2000) Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. *Enzy. Microbiol. Technol.*, 26:3-14.
- Loudiere, S., Durand, A., Grajek, W. (1987) Temperature and influence on pectinolytic activities of some fungi cultured in solid state medium. *Journal European Congresso Biotechnology*, v. 3, p. 258-263,
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., Brock, T. D. (1996). *Biology of microorganisms*: 8. ed. New Jersey: Ed. Prentice-Hall, 986 p.
- Maiorano, A. E. (1990) Produção de pectinase por fermentação em estado sólido.. Tese (Doutor em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 262 p.
- Mahmood, A.U., Greenman, J.; Scragg, A.H. (1998) Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme Microbial Technol.* 22, 130-137.

- Malvessi, E.; Silveira, M. M. (2004) Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 693-702.
- Martin, N., Gueza, M., Leitea, R., Da Silva, R., Gomes, E. (2007) Study of pectinase produced by thermophilic fungi *Rhizomucor* sp. N31 in FES. *Journal of Biotechnology* 131, 158.
- Martins, R. F., Hatti-Kaul, R. (2002) A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic *Bacillus agaradhaerens* isolate: purification and characterisation. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: p. 116-124.
- Martin, N., Souza, S. R., Silva, R., Gomes, E. (2004) Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 47, n. 5, p. 813-819.
- Mayans, O., Scott, M., Connerton, I., Gravesen, T., Benen, J., Visser, J., Pickersgill, R., Jenkins, J. (1997) Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure*, v. 5, n. 5, 677-689.
- Mathew, A., Eldo, A.N., Molly, A.G., (2008) Optimization of culture conditions for the production of thermostable polygalacturonase by *Penicillium* SPC-F 20. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:1001–1005.
- Medeiros, A. B. P., Pandey, A., Freitas, R. J. S., Christen, P., Soccol, C. R. (2000) Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, v. 6, 33-39.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry*. 31: p. 426-428.
- Ming Chu, I.; Lee, C.; LI, T.S. (1992) Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 14, p. 755-761.
- Mutlu, M., Sarioglu, K., Demir, N., Ercan, M. T., Acar, J. (1999) The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. *Journal of Food Engineering*, v. 41, 147-150.
- Nascimento W.C.A., Martins M.L.L. (2006) Studies on the stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent. *Braz J Microbiol* 37: 307-311.

- Niture S.K.; Pant, A. (2004) Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. *Microbiology Resource*, v.159, p. 305–314.
- Nunes, A. S., Martins, M. L. L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Braz. J. Microbiol.*, 32:271-275.
- Oliveira, P. C., Alves, G. M., Castro, H. F., Mei, L. H. I (2000) Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno e divinilbenzeno. *Química Nova*, 23(5):632-636.
- Ortega N, de Diego S, Perez-Mateos M, Busto MD, (2004) Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chem* 88: 209– 217.
- Pal, M., Calvo, A. M., Terrón, M. C., González, A. E., (1995). Solid-state fermentation of sugarcane bagasse with *Flammulina velutipes* and *trametes versicolor*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11, pp.541-545.
- Pardo, C., Lapena, M. A., Gacto, M. (1991) Purification and characterization of an extracelular exopolygalacturonase from *Geotrichum lactis*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 37, n. 12, p. 974-977.
- Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*., 83: 346-356.
- Pilnik, W., Voragen, A. G. J. (1993) Pectic enzymes in fruit and vegetable juice manufacture. *Enzymes and food processing*. New York: Academic Press, P. 363-399.
- Phutela U, Dhuna V, Sandhu S, Chadha BS, Braz J, (2005) Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decompostiong orange peels. *Microbiol* 36: 63.
- Rexová-Benková, L., Marcovic, O. (1976) Pectic Enzymes. In: TIPSON, R. S.; Norton, D. (Ed.) *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. New York: Academic Press,. p. 323-385.
- Riou, C., Freyssinet, G., Fevre, M. (1992) Purification and characterization of extracellular pectinolytic enzyme produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 578–583.
- Rivas, B., Moldes, A.B., Biotecnol, J.M., Parajó, J.C. (2004) Development of culture media contining spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *Inter J of Food Microbiol.* 97:93-98.
- Rizzato, M. L. (1999) Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de Laranja industrializado.. Tese (Mestre em Engenharia de

Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 89 p.

- Sharma, D.C, Satyanarayana, T. (2006) A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Biores Technol* 97: 727–733.
- Sakai, T.; Sakamoto, T.; Hallaert, J. (1993) Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, New York, v. 39, p.213-294.
- Siéssere, V. (1991) Otimização das Condições de Cultivo para Produção e Caracterização parcial das enzimas pectinolíticas de *Penicillium frequentans*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. 118 p.
- Siliha, H. A. I.; Pilnik, W. (1985) Cloud stability of apricot néctar. *Technology Komm.* IFU XVIII, p 325-334.
- Silva CR, Delatorre AB, Martins MLL, (2007) Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity. *Braz J Microbiol* 38: 253-258.
- Sheen Z.; Manning G.; Reese, J. C.; Reeck, G. R. (1999) Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.): Purification and characterization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Oxford, v. 29, n. 3, p. 209-214
- Soares M.M.C.N., da Silva R, Gomes E, (1999) Screening of bacterial strains or pectinolytic activity : characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 30: 299-303.
- Soares, M. M. C. N., SILVA, R., CARMONA, E. C., GOMES, E. (2001) Pectinolytic enzymes production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *World Journal Microbiology Biotechnology*, Dordrecht, v. 17, n. 1, p. 79-82.
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. S. (2003) Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, 205-218.
- Solis-Pereyra, S., Favela-Torres, E., Gutiérrez-rojas, M., Saucedo-Castañeda, G., Gunaseparan, P., Viniestra-González, G., (1996) Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 12, pp.257-260.
- Tardy, F., Nasser, W., Robert-Baudouy, J., Hugovieux-Cotte-Pattat, N. (1997) Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *Journal of Bacteriology*, 179: p.2503-2511.

- Tari, C., Genckal, H., Tokatli, F. (2006) Optimization of a growth using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Process Biochemistry*. 41:659-665.
- Uenojo, M., Pastore, G.M. (2007) Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 388-394,.
- Ustok F.I., Tari C., Gogus N., (2007) Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. *J Biotechnol* 127:322-334.
- Van Den Burg, B. (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6: 213–218.
- Wang, X.-D., Rakashit, S.K. (1999) Improved extracellular transferase enzyme production by *Aspergillus foetidus* for synthesis of isooligosaccharides. *Bioprocess Engineering*. 20:429-434.
- Wang, Q., Fan, X., Huab, Z., Chenb, J. (2007) Optimizing bioscouring condition of cotton knitted fabrics with an alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* WSHB04-02 by using response surface methodology *Biochemical Engineering Journal* 34 107–113,
- Wiseman, A. (1985) *Manual de Biotecnologia de los enzimas*. Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha.
- Whitaker, J. R. (1994) Pectic enzymes. *Principles of Enzimology for the Food Sciences*, 2nd edition, New York, 425-436.
- Woose, C.R., Kandler, O., Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposals for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Nati. Acad. Sci.*, 87:4576-4579.
- Yoshitake, S.; Numata, T.; Katsuragi, T. (1994) Purification and characterization of a pectin-releasing enzyme produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Osaka, v. 77, n. 4, p. 370-375.
- Zamost, B. L., Nielsen, H. K., Starnes, R. L. (1991) Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*, 8:71-82.
- Zheng, Z., Shetty, K. (2000) Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process Biochemistry*, v. 35, n. 8, 825-830.