

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UnB

PAULA MARCELA DUQUE JARAMILLO

**Produção, Caracterização e Aplicação Biotecnológica de
Pectinases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em
casca de maracujá-amarelo**

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

**Produção, Caracterização e Aplicação Biotecnológica de
Pectinases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em
casca de maracujá-amarelo**

PAULA MARCELA DUQUE JARAMILLO

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biologia Molecular da
Universidade de Brasília como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor.

Brasília, 06 de Maio de 2014

**Produção, Caracterização e Aplicação Biotecnológica de
Pectinases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em
casca de maracujá-amarelo**

PAULA MARCELA DUQUE JARAMILLO

Banca examinadora:

- Dra. Mônica Caraméz Triches Damaso – Pesquisadora do Laboratório de Processos Bioquímicos/Embrapa Agroenergia.
- Professor Dr. Maurício Homem de Mello – Faculdade Ciências da Saúde/Laboratório de Toxicologia da Universidade de Brasília.
- Professora Dra. Nádia Skorupa Parachin - Departamento de Biologia Celular/ Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília.
- Professor Dr. Carlos André Ornelas Ricart – Departamento de Biologia Celular/Laboratório de Bioquímica e Proteômica da Universidade de Brasília.

Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho
IB/UnB
(Orientador)

Brasília, 6 Maio de 2014

“A grande vitória que hoje parece fácil foi o resultado de uma série de pequenas vitórias que passaram despercebidas”.

Paulo Coelho

Dedico

A mis padres, Luís Gustavo y María Cristina por todo el amor, confianza, cariño, comprensión, lecciones de vida, educación y formación. Este es un logro mutuo!

Agradecimentos

A Deus, minha fortaleza, que me deu coragem e energia para enfrentar cada um dos desafios que se me apresentaram ao longo do caminho e por me permitiu compartilhar esta vitória com meus entes queridos;

Aos meus pais, Gustavo e Cristina, que, mesmo a distância, estiveram sempre presentes, me apoiando e acreditando sempre em mim. Obrigada pelo amor, carinho, amizade e lições de vida. MUCHAS GRACIAS POR TODO! ;

Ao professor Dr. Edivaldo, muito obrigado pela confiança e pelo apoio para concluir mais uma etapa da minha vida;

Ao Mauricio, companheiro, amigo e confidente que fez deste tempo muito mais fácil e prazeroso. Muito obrigada por tudo. Te amo;

À professora Dra. Pérola, por ter me acolhido como uma de suas orientadas, pela ajuda, segurança e confiança depositadas em mim. Agradeço também a toda sua equipe de trabalho, estudantes e técnicas, que me recebeu e ajudou com muito carinho;

Ao professor Dr. Jürgen e a toda sua equipe de trabalho, muito obrigada pelo carinho, atenções e pela ajuda prestada na realização dos experimentos;

Ao professor Dr. Mauricio Mello, pelas valiosas colaborações tanto no laboratório quanto nas contribuições para a melhoria deste trabalho;

Aos professores Dr. Carlos André e Dra. Nádia e à pesquisadora Dra. Mônica, pelas contribuições ao trabalho;

Aos meus tios e primos, muito obrigada pela ajuda, companhia, carinho, compreensão e pelo apoio, tanto para comigo quanto para meus pais em todo este tempo que estive distante;

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, pela qualidade de suas estruturas oferecidas;

Ao Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília, pelos experimentos ali realizados;

Ao Laboratório de Química têxtil do Departamento de Química da Fundação Universidade Regional de Blumenau, por me receber e proporcionar a infraestrutura necessária para a realização dos experimentos deste trabalho. Agradeço também aos seus integrantes, Giovana Vieira, Djonatam e André, por terem me acolhido, ajudado e apoiado. Muito obrigada!

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, pela ajuda com o processamento e análise das amostras;

Aos amigos do laboratório (Helder, Caio, Barbara, Juliana, Elizabeth, Glaucia, Camila, Antonielle, Brenda, Karen, Leonora, Priscila, Jackeline, Gilvan, Debora, Pedro, Carol) e externos (Anelise, Gil), muito obrigada por todos os momentos compartilhados e pela valiosa ajuda nos vários momentos que precisei;

Às técnicas do laboratório, Margarete e Marísia, muito obrigada pela ajuda e carinho;

Aos queridos Felix Siqueira e o Jorge William, muito obrigada pela confiança e por me ensinar o caminho;

Ao Helson, muito obrigada pela ajuda e apoio desde o começo, por estar sempre disposto a me escutar, me ajudar e por ter contribuído com a melhoria deste trabalho;

Às minhas amigas, Amanda, Vivian Marcela, Gloria Maria, Adriana, que, mesmo desde a distância, acreditaram em mim e me apoiaram nos momentos que mais precisei;

A todos e cada uma das pessoas que me ajudaram, escutaram, apoiaram e acompanharam, o meu MUITO OBRIGADA de todo coração!

Apoio financeiro

Esta pesquisa foi desenvolvida com o apoio financeiro do CNPq, por meio da concessão de bolsa de estudos e pelos projetos de pesquisa: Edital MCT/CNPq nº 70/2009 - Mestrado/Doutorado (CNPQ/141764/2010-4), Redes Sisbiota (CNPq/563260/2010-6), Rede Centro Oeste (CNPq/563823/2010-0 e FAPDF/193.000.470/2011) Universal (CNPq/470265/2011-6), Pronex (FAPDF/193000584/2009) e INCT do Bioetanol/CNPq.

Sumário

	Pág.
Capítulo 1. Introdução, Objetivo e Justificativa	1
Resumo	1
Abstract	3
1. Introdução	4
1.1. Substâncias pécticas	5
1.2. Enzimas pectinolíticas	9
1.3. Fungo filamentoso <i>Aspergillus oryzae</i>	14
1.4. Maracujá-amarelo (<i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg)	18
1.5. Biopurga (<i>BioScouring</i>)	22
1.6. Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas (SMDFA)	27
2. Justificativa	32
3. Objetivos	33
Referências bibliográficas	34
Capítulo 2. Produção, Purificação parcial e caracterização de pectinases produzidas pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i> crescido em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono	45
Resumo	45
Abstract	46
1. Introdução	47
2. Objetivos	48
3. Material e métodos	48

	Pág.
3.1. Origem dos reagentes	48
3.2. Resíduos agroindustriais	49
3.2.1. Origem dos resíduos	49
3.2.2. Pré-tratamento	49
3.2.3. Análise bromatológica	50
3.2.3.1. Análise dos extraíveis	50
3.2.3.2. Análise da hemicelulose	51
3.2.3.3. Análise de lignina	51
3.2.3.4. Análise de celulose	51
3.3. Isolamento, manutenção e identificação do fungo	52
3.4. Conservação do fungo	52
3.5. Cultivo em meio líquido	52
3.6. Determinação da atividade enzimática das holocelulases	53
3.7. Proteína total	54
3.8. Curva de produção enzimática	54
3.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	54
3.10. Ultrafiltração	55
3.11. Purificação parcial em cromatografia de exclusão molecular	55
3.12. Cromatografia de troca iônica	56
3.13. Caracterização enzimática	56
3.14. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	57
3.15. Coloração de proteínas por nitrato de prata	58
3.16. Zimograma	58

	Pág.
3.17. Termoestabilidade	59
3.18. Efeito de íons metálicos	59
3.19. Efeito de compostos fenólicos	59
3.20. Viscosidade	60
3.21. Análises estatísticas	60
4. Resultados e discussão	61
4.1. Produção enzimática	61
4.2. Caracterização do extrato bruto	64
4.3. Ultrafiltração	67
4.4. Cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-200)	70
4.5. Cromatografia de troca iônica (HiTrap Q FF)	71
4.6. Eletroforese – SDS-PAGE e Zimograma	73
4.7. Caracterização da pectinase parcialmente purificada	74
4.8. Avaliação da viscosidade	80
5. Conclusões	81
6. Perspectivas	82
Referências bibliográficas	82
Capítulo 3. Uso de pectinases produzidas pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i> crescido em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono no processo de biopurga da indústria têxtil	88
Resumo	88
Abstract	89
1. Introdução	90
2. Objetivo	91

	Pág.
3. Material e métodos	92
3.1. Concentrado, preparações comerciais e produtos auxiliares	92
3.2. Biopurga	93
3.3. Umectabilidade (Teste da Gota)	94
3.4. Tingimento do tecido com vermelho de rutênio	94
3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	95
4. Resultado e discussão	96
4.1. Caracterização enzimática	96
4.2. Umectabilidade (Teste da Gota)	97
4.3. Reflexão espectral (K/S)	98
4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	100
5. Conclusões	104
Referências bibliográficas	104
Capítulo 4. Extração líquido-líquido de pectinases produzidas pelo fungo <i>Aspergillus oryzae</i> usando o sistema micelar de duas fases aquosas - artigo publicado na revista <i>separation and purification technology</i> (2013)	108
Resumo	108
Abstract	109
1. Introdução	110
2. Objetivo	112
3. Material e métodos	112
3.1. Origem dos reagentes	112
3.2. Cultivo em meio submerso	112
3.3. Ultrafiltração	113

	Pág.
3.4. Determinação da atividade enzimática e proteína total	113
3.5. Mapeamento da curva de coexistência do sistema tampão fosfato de sódio/Triton [®] X-114	113
3.6. Planejamento experimental	113
3.7. Delineamento experimental	114
3.8. Clarificação do concentrado com Triton [®] X-114	115
4. Resultados e discussão	116
5. Conclusões	123
Referências bibliográficas	130
Apêndice 1. Biomass-derived inhibitors of holocellulases	134
Apêndice 2. Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado brasileiro	135
Apêndice 3. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi	137
Apêndice 4. Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues	138
Apêndice 5. Capítulo publicado no livro: Fungal bio-molecules: sources, applications and recent developments (no prelo) – chapter: Lignocellulose-degrading enzymes: an overview of global market	140
Anexo 1. Identificação genotípica do fungo filamentoso <i>Aspergillus oryzae</i> ...	142
Anexo 2. Protocolo substratos para ensaio enzimático	144
Anexo 3. Protocolo solução de Karnovsky - microscopia eletrônica de varredura	145

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Composição química da parede celular e as enzimas envolvidas na sua degradação	6
Figura 2. Estrutura primária de uma molécula de pectina	7
Figura 3. Estrutura básica da pectina	8
Figura 4. Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação sobre substâncias pécticas	12
Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura do fungo <i>A. oryzae</i>	16
Figura 6. Produção nacional de maracujá-amarelo	19
Figura 7. Frutos de maracujá-amarelo	20
Figura 8. Representação esquemática da estrutura morfológica da fibra de algodão	22
Figura 9. Representação esquemática da cadeia de processamento de algodão, desde a preparação da fibra até o consumidor	24
Figura 10. Fluxograma do beneficiamento químico na indústria têxtil e aplicações de enzimas nos processos têxteis	25
Figura 11. Estrutura geral dos surfactantes no meio hidrofóbico.....	28
Figura 12. Representação esquemática da separação de fases em um sistema micelar aquoso utilizando Triton [®] X-114 com o aumento da temperatura	29
Figura 13. Molécula do surfactante octilfenoxi polietoxietanol não-iônico (Triton [®] X-114)	31
Figura 14. Resíduos agroindustriais pré-tratados	50
Figura 15. Determinação da atividade pectinolítica e dosagem de proteínas totais do cultivo em meio líquido do fungo <i>A. oryzae</i> crescido em quatro fontes de carbono (maracujá-amarelo, limão-taiti, laranja 'pêra' e pó-de-filtro por seis dias a 28°C com agitação constante (120 rpm)	61
Figura 16. Perfil cinético de produção de pectinases pelo fungo <i>A. oryzae</i> crescido em casca de maracujá como fonte de carbono por 20 dias.	63
Figura 17. Micrografias da casca de maracujá-amarelo colonizada pelo fungo <i>A. oryzae</i> após 10 dias de cultivo por MEV	64

	Pág.
Figura 18. Efeito da temperatura e do pH na atividade pectinolítica do extrato bruto	66
Figura 19. Efeito da temperatura e do pH na atividade pectinolítica do concentrado	68
Figura 20. Termoestabilidade da pectinase do extrato bruto e concentrado a 50°C.....	69
Figura 21. Perfil cromatográfico do concentrado em Sephacryl S-200	70
Figura 22. Perfil cromatográfico do concentrado em resina de troca iônica em HiTrap Q FF	71
Figura 23. Fluxograma das etapas de purificação parcial da PEC-P1.....	73
Figura 24. Gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%) e zimograma	74
Figura 25. Efeito da temperatura e do pH na atividade pectinolítica da PEC-P1	76
Figura 26. Termoestabilidade da PEC-P1	77
Figura 27. Estrutura de fibra de algodão	90
Figura 28. Etapas do tingimento realizado no banho de tingimento modelo Mathi ALT-1 com aquecimento por infravermelho	95
Figura 29. Tratamentos realizados com a biopurga. Valores da umectabilidade dos tecidos tratados determinada pelo teste da gota	97
Figura 30. Tratamentos realizados com a biopurga. Dados de reflexão espectral (K/S) dos tecidos tingidos com vermelho de rutênio	99
Figura 31. Micrografias dos tecidos mediante MEV	102
Figura 32. Diagrama de fases do sistema micelar tampão fosfato de sódio/Triton [®] X-114 mostrando as regiões monofásicas e bifásicas	117
Figura 33. Avaliação dos pigmentos coloridos visíveis presentes na fase micelar pobre em micelas (fase topo) do SMDFA com a adição do concentrado	120
Figura 34. Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis temperatura (X1), concentração de Triton [®] X-114 (X2) e concentração do concentrado (X3) em UI/ML na fase pobre em micelas na clarificação do concentrado pelo SMDFA.....	122

Figura 35. Esquema da clarificação do concentrado com a extração de compostos presentes no meio de cultivo pelo sistema micelar de duas fases aquosas (SMDFA)	123
--	-----

Lista de Tabelas

	Pág.
Tabela 1. Enzimas pectinolíticas que degradam as cadeias de HG da pectina	10
Tabela 2. Aplicações industriais das pectinases	13
Tabela 3. Composição centesimal e de minerais de cascas in natura de maracujá-amarelo (<i>P. edulis</i> fo. <i>flavicarpa</i>)	21
Tabela 4. Composição aproximada do algodão	23
Tabela 5. Análise bromatológica da casca de maracujá-amarelo	62
Tabela 6. Holocelulases presentes no extrato bruto de <i>A. oryzae</i> crescido em casca de maracujá-amarelo por 10 dias	65
Tabela 7. Perfil enzimático das frações, ultrafiltrado e concentrado, usando membrana de corte de 10 kDa	67
Tabela 8. Especificidade pelo substrato da PEC-P1	75
Tabela 9. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade pectinolítica da PEC-P1	78
Tabela 10. Efeito de compostos fenólicos na atividade pectinolítica da PEC-P1	79
Tabela 11. Avaliação da viscosidade do suco de goiaba após tratamento enzimático	80
Tabela 12. Dados do tempo de absorção (em segundos) dos tecidos previamente tratados	98
Tabela 13. Dados de reflexão espectral dos tecidos tratados e tingidos com vermelho de rutênio	99
Tabela 14. Matriz do planejamento fatorial 2^3 com ponto central em triplicata para a extração de pectinase utilizando SMDFA	114
Tabela 15. Valores das variáveis do planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central utilizado para avaliar a influência da temperatura, Triton® X-114 e concentrações do concentrado na clarificação pelo SMDFA	117

	Pág.
Tabela 16. Matriz do planejamento fatorial 2^3 com ponto central em triplicata para a clarificação do concentrado utilizando SMDFA (tampão fosfato de sódio/Triton® X-114)	118
Tabela 17. Análise de variância (ANOVA) para a clarificação do concentrado avaliando a atividade enzimática na fase superior como variável de resposta	121

Lista de Abreviaturas

- BDA:** Batata Dextrose Agar
- BSA:** Albumina Sérica Bovina
- DNS:** Ácido 3,5-dinitro-salicílico
- DBO:** Demanda Bioquímica de Oxigênio
- DQO:** Demanda Química de Oxigênio
- FDA:** *Food and Drug Administration*
- GalA:** α -D-ácido galacturônico
- GRAS:** *Generally Regarded As Safe*
- HG:** Homogalacturonana
- LMW:** Marcador de Baixa Massa Molecular
- MEV:** Microscopia Eletrônica de Varredura
- PE:** Pectina metil esterases
- PEC-P1:** Pectinase parcialmente purificada
- PG:** Poligalacturonase
- PGL:** Pectato liase ou Poligalacturonato liase
- PIB:** Produto Interno Bruto
- PL:** pectina liase
- PMG:** Polimetilgalacturonase
- PMGL:** Pectina liase ou Polimetilgalacturonato liase
- RG:** Ramnogalacturonana
- RGI:** Ramnogalacturonana I
- RGII:** Ramnogalacturonana II
- SDS:** Dodecilsulfato Sódico
- SMDFA:** Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas
- TCA:** Ácido Tricloroacético
- UHPLC:** Cromatografia Líquida de Ultra Performance
- V_{ex}:** Teoria do volume de exclusão

Capítulo 1

Resumo, Introdução, Objetivo e Justificativa

Resumo

Como consequência da produção significativa de suco, as cascas, como um dos principais resíduos, tem se tornado um problema ambiental e para isso tem sido necessário determinar formas viáveis para transformá-las em produtos úteis ou de dispor adequadamente delas buscando um impacto ambiental positivo e um interesse econômico. O trabalho objetivou produzir, purificar parcialmente e caracterizar pectinases secretadas pelo fungo *Aspergillus oryzae* quando crescido em casca de maracujá-amarelo como única fonte de carbono por 10 dias a 28°C em agitação constante (120 rpm). Após ultrafiltração com membrana de 10 kDa, o concentrado foi avaliado na sua capacidade de reduzir a viscosidade do suco de goiaba e no processo de biopurga têxtil, obtendo resultados satisfatórios. Posteriores etapas cromatográficas, filtração em gel (Sephacryl S-200) e troca iônica (HiTrap Q FF.), purificaram parcialmente uma pectinase, PEC-P1, a qual foi caracterizada quanto ao melhor pH e temperatura, efeito de íons e compostos fenólicos, especificidade pelo substrato, termoestabilidade e análises de gel de eletroforese SDS-PAGE e zimograma. Além disso, a enzima foi testada quanto a sua capacidade de reduzir a viscosidade do suco, obtendo resultados insatisfatórios. A PEC-P1 apresentou maior atividade no pH 4,5 e nas temperaturas de 55°C, 70°C e 75°C. Os íons Ag^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ca^{2+} e Hg^{2+} e o EDTA tiveram efeito negativo, em diferentes porcentagens, e o íon Cu^{2+} ativou a atividade enzimática. A PEC-P1 foi ativada pelo ácido ferúlico, cinâmico e 4-hidroxibenzoico e inibida por ácido tânico e a vanilina. No gel sob condições desnaturantes do extrato bruto, do concentrado e da PEC-P1 foram detectadas duas bandas de proteína de aproximadamente 43 e 45 kDa, coincidente com a coloração para atividade de pectinase. A meia vida a 50°C foi de 1440 minutos.

Este trabalho se apresenta como o primeiro registro da produção de pectinases pelo fungo *A. oryzae* crescido em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono em meio líquido.

Palavras-chaves: Pectinase, *Aspergillus oryzae*, purificação parcial, casca de maracujá-amarelo, meio submerso.

Abstract

As a result of significant production of juice, peels, as a major waste has become an environmental problem and it has been necessary to determine feasible ways to turn them into useful products or dispose of them properly seeking a positive environmental impact and an economic interest. The study aimed to produce, purify and partially characterize pectinases secreted by the fungus *Aspergillus oryzae* when grown in yellow passion fruit peel as the sole carbon source for 10 days at 28°C under constant agitation (120 rpm). After 10 kDa ultrafiltration membrane, the concentrate was evaluated on its ability to reduce the viscosity of guava juice and biopurga textile process, obtaining satisfactory results. Subsequent chromatographic steps, gel filtration (Sephacryl S-200) and ion exchange (HiTrap Q FF.) Partially purified a pectinase, PEC-P1, which was characterized as the best pH and temperature, effect of ions and phenolic compounds, substrate specificity, thermostability and analysis of SDS-PAGE gel and zymogram. Furthermore, the enzyme was tested for its ability to reduce the viscosity of the juice obtained unsatisfactory results. The PEC-P1 showed greater activity in the pH 4.5 and at temperatures of 55°C, 70°C and 75°C. The Ag⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Co²⁺, Ca²⁺ and Hg²⁺ ions and EDTA had a negative effect, in different percentages, and Cu²⁺ ion activated enzyme activity. The PEC-P1 was activated by ferulic acid, cinnamic acid and 4-hydroxybenzoic acid and inhibited by tannic acid and vanillin. The gel under denaturing conditions of the crude extract, concentrate and PEC-P1 two protein bands of approximately 43 and 45 kDa, coincident with staining for pectinase activity were detected. The half-life at 50°C was 1440 minutes.

This work presents itself as the first record of pectinase production by the fungus *A. oryzae* grown in yellow passion fruit peel as the carbon source in liquid medium.

Keywords: Pectinase, *Aspergillus oryzae*, partial purification, the yellow passion fruit peel, submerged medium.

1. Introdução

As pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas, de alta massa molecular, que degradam as substâncias pécticas que, por sua vez, são polissacarídeos estruturais da lamela media e da parede celular primaria das plantas superiores (JAYANI et al., 2005). As substâncias pécticas são caracterizadas pelo alto conteúdo de resíduos de ácido galacturônico unido por ligações α -1,4 parcialmente esterificados por grupos metil éster (KASHYAP et al., 2001).

As pectinases são classificadas de acordo com a preferência pelo substrato, mecanismo de reação e padrão de ação sobre a cadeia do polímero de galacturonato (COLLMER et al., 1988; SOARES et al., 2001). Elas apresentam diferentes preferências pelas formas metiladas ou não metiladas da pectina ou pela clivagem das ligações glicosídicas internas ou terminais da cadeia da molécula (REID; RICARD, 2000). Estas são amplamente utilizadas na indústria de processamento de frutas e vegetais, porque reduzem a viscosidade de sucos e facilitam os processos de extração, maceração, liquefação e de clarificação (NAIDU; PANDA, 1998).

As leveduras e os fungos filamentosos são os micro-organismos mais importantes para a produção de enzimas de interesse biotecnológico e industrial devido à grande variedade de atividades catalíticas, à possibilidade da produção das enzimas por processos fermentativos em grande escala e à simplicidade dos requerimentos nutricionais (BON et al., 2008).

As fibras de algodão contêm aproximadamente 10% de impurezas não-celulósicas, cujo conteúdo depende da variedade e do ambiente de crescimento. A pectina é uma das principais impurezas não celulósicas das fibras de algodão e está localizada principalmente na cutícula da parede primária. A natureza hidrofóbica de ceras e pectinas é responsável pelo comportamento hidrofóbico do algodão natural que impede um tingimento uniforme e um acabamento eficiente, etapas comumente realizadas sob condições aquosas (KALANTZI et al., 2008).

A aplicação da biotecnologia também está crescendo na indústria têxtil. O uso de enzimas em substituição aos produtos químicos, normalmente utilizados em alguns processos têxteis, reduz consideravelmente o impacto ambiental assim como os danos às fibras. Fato este pelo qual nos últimos anos, com a crescente conscientização e preocupação com o meio ambiente, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de aplicar enzimas nas diferentes etapas do beneficiamento têxtil. O uso de enzimas na etapa da purga (biopurga) visa obter tecidos de fibras naturais com boas propriedades físico - químicas, mecânicas e alta hidrofiliabilidade. Em relação ao processo alcalino, a biopurga é realizada sob condições mais brandas, com menor consumo de energia e de produtos auxiliares têxteis, redução da carga poluente e do volume de efluentes.

Estudos sobre estratégias de purificação que utilizam processos únicos, simples e de baixo custo os quais possam produzir altos fatores de purificação e de recuperação de enzimas, são de grande interesse para a indústria biotecnológica. Os processos de extração líquido-líquido são amplamente utilizados na indústria química devido à sua simplicidade, baixo custo, e facilidade de ampliação de escala. Particularmente, o sistema micelar de duas fases aquosas (SMDFA) baseia-se no fato de que certas soluções micelares, sob determinadas condições, são capazes de se separar espontaneamente em duas fases aquosas, ainda que imiscíveis, entre as quais proteínas e outras biomoléculas podem se distribuir desigualmente (LIU et al., 1998).

1.1. Substâncias pécticas

Os polissacarídeos da parede celular das plantas são os compostos orgânicos mais abundantes da natureza. Estes compostos consistem principalmente, de polissacarídeos tais como celulose, hemicelulose e pectina, formando a estrutura holocelulósica, e de complexos fenólicos como a lignina (Figura 1). Juntos, os polissacarídeos e a lignina fornecem alta complexidade e rigidez à parede celular das plantas (SOUZA, 2013). Os fatores que envolvem a deposição da pectina durante a formação da parede celular ainda não estão elucidados (CANTERI et al., 2012).

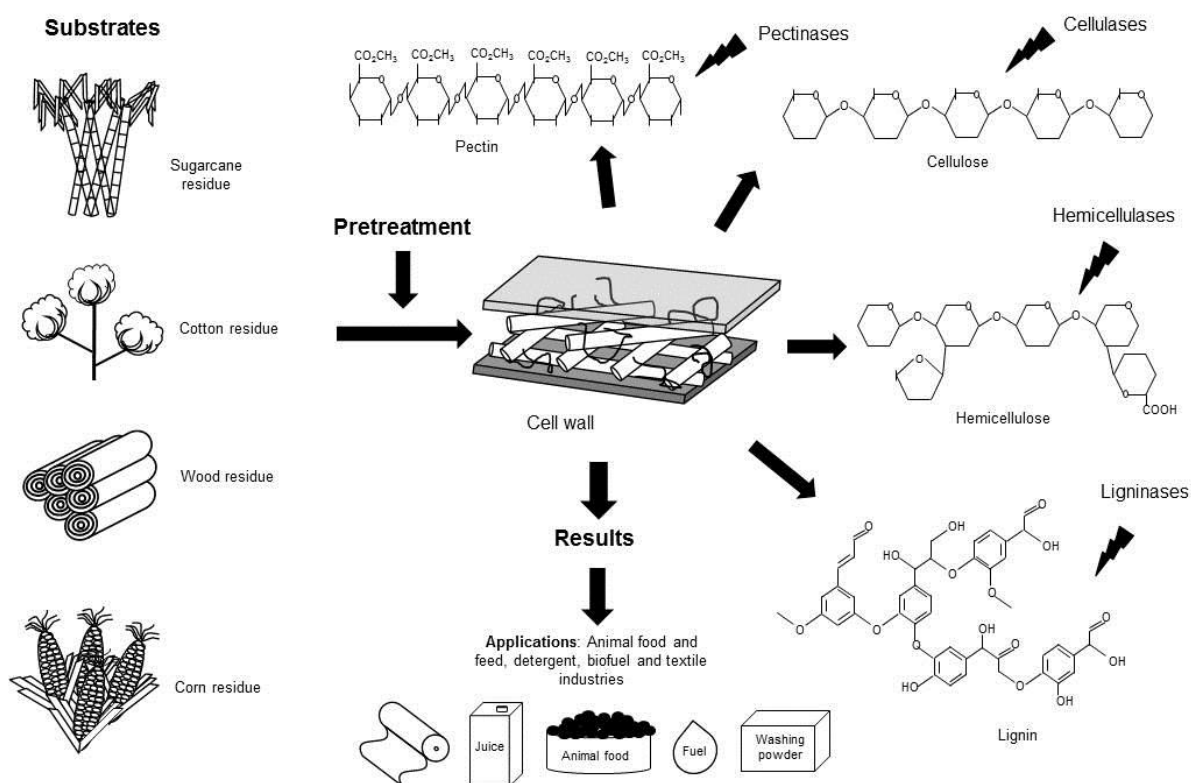


Figura 1. Composição química da parede celular e as enzimas envolvidas na sua degradação.

Quimicamente, as pectinas são um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, composto de resíduos de α -D-ácido galacturônico (GalA) unidos por ligações α -1,4 (UENOJO et al., 2007) (Figura 2) e grau variável de grupos carboxilas metil esterificados (ALANÑA et al., 1992) que se encontram principalmente na lamela média e na parede celular primária de plantas superiores sob a forma de pectato de cálcio e de magnésio (SIEIRO et al., 2012). Ao contrário das proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, as substâncias pécticas não têm um peso molecular definido. As massas moleculares relativas de substâncias pécticas podem variar desde 25 até 360 kDa (JAYANI et al., 2005). As cadeias laterais da molécula de pectina podem estar formadas por L-ramnose, arabinose, galactose e xilose (KASHYAP et al., 2001). Em geral, a L-ramnose faz parte da cadeia principal, enquanto que a arabinose e galactose são encontrados nas cadeias laterais ligadas à cadeia principal por ligações covalentes.

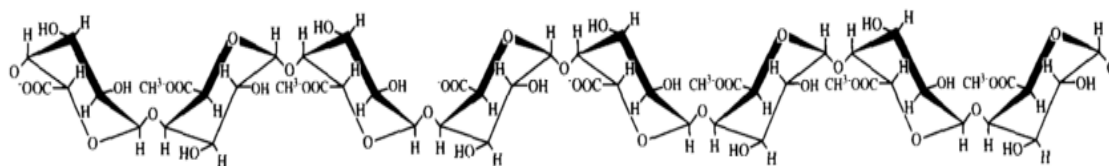


Figura 2. Estrutura primária de uma molécula de pectina (ALAÑA et al., 1992)

Com base no tipo de modificações da cadeia principal, as substâncias pécnicas são classificadas em galacturonanas, protopectina, ácido pécnico, ácido pécnico e pectina (KASHYAP et al., 2001).

As galacturonanas são polissacarídeos que consistem fundamentalmente de α -1,4 ácido galacturônico com um grau variável de esterificação (HEREDIA et al., 1995).

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

Os ácidos pécnicos são galacturonanas contendo pequena quantidade de grupos metoxila. Os sais de ácidos pécnicos são chamados de pectatos. (MCFEETERS; ARMSTRONG, 1984).

Os ácidos pécnicos são galacturonanas com vários grupos metoxilas que possuem a propriedade de formar gel com açúcares e ácidos ou com outros compostos tais como sais de cálcio (UENOJO et al., 2007). Os sais de ácidos pécnicos são chamados de pectinatos (REDDY; SREERAMULU, 2012).

A pectina é um nome genérico para a mistura de diversas composições contendo ácido pécnico como principal componente, com graus variáveis de

esterificação por grupos metil. A pectina em sua forma nativa é localizada na parede celular e pode estar associada com outros polissacarídeos e proteínas estruturais para formar protopectina insolúvel (REXOVÁ-BENKOVÁ; MARKOVIĆ, 1976).

A pectina pode ser dividida em duas regiões: regiões não ramificadas (*Smooth regions*) e em regiões ramificadas (*Hairy regions*) (Figura 3), sendo composta por três polissacarídeos estruturalmente bem caracterizados: homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RGI) e ramnogalacturonana II (RGI).

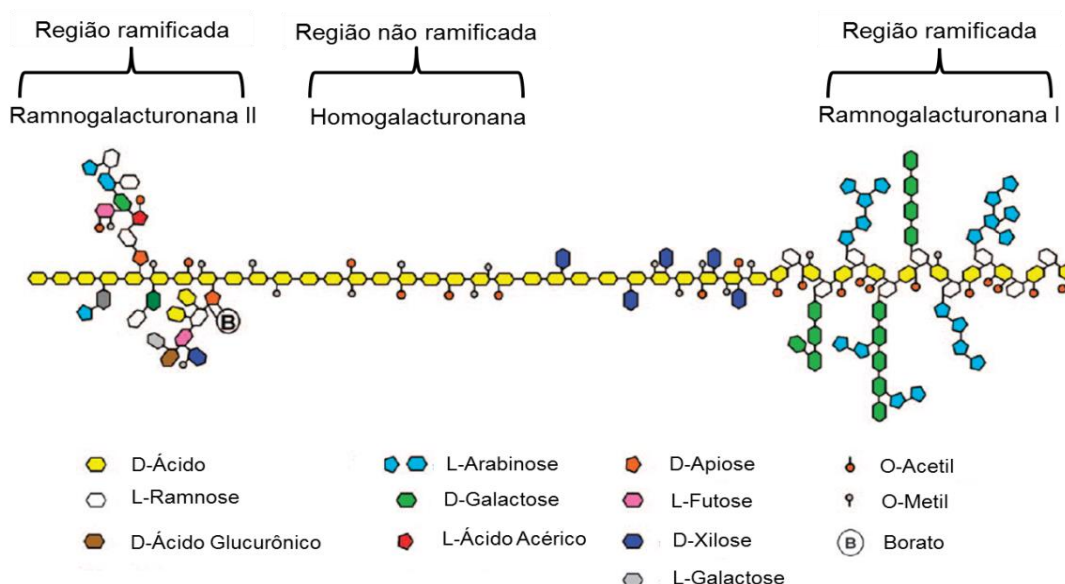


Figura 3. Estrutura básica da pectina. Adaptada de Scheller et al. (2006).

A homogalacturonana (HG) representa a cadeia principal da molécula de pectina (Figura 3). É o polissacarídeo pécico mais abundante na parede celular, correspondendo a cerca de 60-65% do total da pectina. Apresenta unidades de ácido α -D-galactopiranosilurônico em ligações α -1 \rightarrow 4 num padrão linear. Os grupos carboxilas estão parcialmente metil-esterificados. A homogalacturonana está envolvida no controle da porosidade da parede celular, na integridade, na rigidez relativa, nas propriedades mecânicas, na adesão intercelular e no controle do ambiente iônico da parede celular (CANTERI et al., 2012).

A ramnogalacturonana I (RGI) consiste em uma cadeia que alterna resíduos de ácido galacturônico com resíduos de ramnose [1→4-α-D-GalA-(1→2)-α-L-Ramnose(1→4)] (Figura 3), nos quais podem ser encontradas ligadas covalentemente, cadeias laterais de resíduos de açúcares neutros como galactose e arabinose por ligações glicosídicas α-(1→5) (SILVA et al., 2013). A composição de açúcares de RG-I pode ser altamente heterogênea e o comprimento das cadeias pode variar consideravelmente. Nas RG-I os resíduos de ácido galacturônico são frequentemente acetilados nas posições C2 e C3 (YADAV et al., 2009). A RG-I representa 20-35% da pectina (SILVA et al., 2013).

A ramnogalacturonana II (RGII) é o segmento estruturalmente mais complexo e compõe 10% da pectina (Figura 3). Essa estrutura, altamente conservada na maior parte das espécies vegetais, consiste de um esqueleto de homogalacturonana de, no mínimo, oito unidades monoméricas, contendo cadeias laterais de até 12 diferentes tipos de açúcares, alguns muito peculiares como apiose, ácido acérico, ácido 3-deoxi-lixo-2-heptulosárico (DHA) e ácido 3-deoxi-mano-2-octulosônico (KDO). A RG-II está presente em paredes celulares como dímeros em ligações cruzadas por um borato diol éster entre unidades apiosil na cadeia lateral (LEROUXEL et al., 2006).

1.2. Enzimas pectinolíticas

As enzimas pectinolíticas ou pectinases são produzidas por plantas superiores e micro-organismos. Elas são de importância primordial nas plantas auxiliando na extensão da parede celular vegetal e no amolecimento de alguns tecidos vegetais durante o amadurecimento e armazenagem. Elas também auxiliam no balanço ecológico, através dos processos de decomposição e reciclagem de resíduos vegetais (MURAD; AZZAZ, 2011).

As pectinases agem através de reações de desesterificação (esterases) e despolimerização (hidrolases e liases). As enzimas pectinolíticas mais conhecidas e estudadas são aquelas que degradam as cadeias de homogalacturonana (HG) da pectina (Tabela 1).

Tabela 1. Enzimas pectinolíticas que degradam as cadeias de HG da pectina.

Nome	Sigla	Classificação da Enzyme Commission (EC)
Esterases		
Pectina metil esterases	PE	EC 3.1.1.11
Pectina acetil esterases		EC 3.1.1.6
Hidrolases		
Endo-polimetilgalacturonases	Endo-PMG	EC 3.2.1.41
Exo-polimetilgalacturonases	Exo-PMG	
Endo-poligalacturonases	Endo-PG	EC 3.2.1.15
Exo-poligalacturonases	Exo-PG	EC 3.2.1.67
Liasas		
Endo-pectina liases	Endo-PL	EC 4.2.2.10
Endo-pectato liases	Endo-PGL	EC 4.2.2.2
Exo-pectato liase	Exo-PGL	EC 4.2.2.9

A pectina metil esterase (PE) (EC 3.1.1.11) catalisa a desesterificação dos grupos metil da pectina, formando metanol e ácido péctico. Estas enzimas agem, preferencialmente, em um grupo metil-éster de uma unidade de galacturonato próxima a uma outra não esterificada (KASHYAP et al., 2001). A pectina acetil esterase (EC 3.1.1.6) promove a desacetilação das cadeias de HG da molécula de pectina (UENOJO et al., 2007).

As hidrolases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, e são classificadas de acordo com sua preferência pelo substrato: as polimetilgalacturonases (PMG) agem sobre a pectina, preferencialmente com alto grau de metilação, liberando 6-metil-D-galacturonato; as poligalacturonases (PG) agem sobre o ácido péctico (ácido poligalacturônico), liberando D-galacturonato. Os dois grupos são, ainda, subdivididos em endopectinases, as quais atuam ao acaso

sobre ligações internas, e exopectinases, que removem moléculas de ácido D-galacturônico a partir da extremidade não redutora (ROMBOUTS; PILNIK, 1980; KASHYAP et al., 2001). As endo-PMG (EC 3.2.1.41) e exo-PMG são responsáveis, respectivamente, pela clivagem randômica da ligação glicosídica α -1,4 na pectina altamente esterificada ou na extremidade não redutora da cadeia de pectina. As PG, classificadas em endo-PG (EC 3.2.1.15) e exo-PG (EC 3.2.1.67), catalisam, respectivamente, a hidrólise randômica e sequencial da ligação glicosídica α -1,4 do ácido péctico na extremidade não redutora da cadeia.

As liases catalisam a clivagem de ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) por transeliminção. São divididas em: pectina liases (PL), que atuam sobre a molécula de pectina, produzindo unidades de 6-metil- Δ -4,5-D-galacturonato; e pectato liases (PGL), que clivam o ácido péctico, liberando Δ -4,5-D-galacturonato. As PGL possuem absoluta dependência de Ca^{2+} , sofrendo, portanto, forte inibição por agentes quelantes como EDTA. Já as PL não apresentam tal dependência, porém podem ser estimuladas na presença de Ca^{2+} e outros cátions (JAYANI et al., 2005).

As liases também são classificadas em endo e exopectinases (ROMBOUTS; PILNIK, 1980; PITT, 1988), porém todas as pectina liases descritas até hoje são endoenzimas (SINITSYNA et al., 2007). A endo-PL (EC 4.2.2.10) catalisa a clivagem randômica da ligação glicosídica α -1,4 da pectina. A endo-PGL (EC 4.2.2.2) catalisa a clivagem aleatória da ligação glicosídica α -1,4 do ácido péctico, enquanto que a exo-PGL (EC 4.2.2.9) catalisa a clivagem sequencial da ligação glicosídica α -1,4 do ácido péctico na extremidade da cadeia (KASHYAP et al., 2000) (Figura 4).

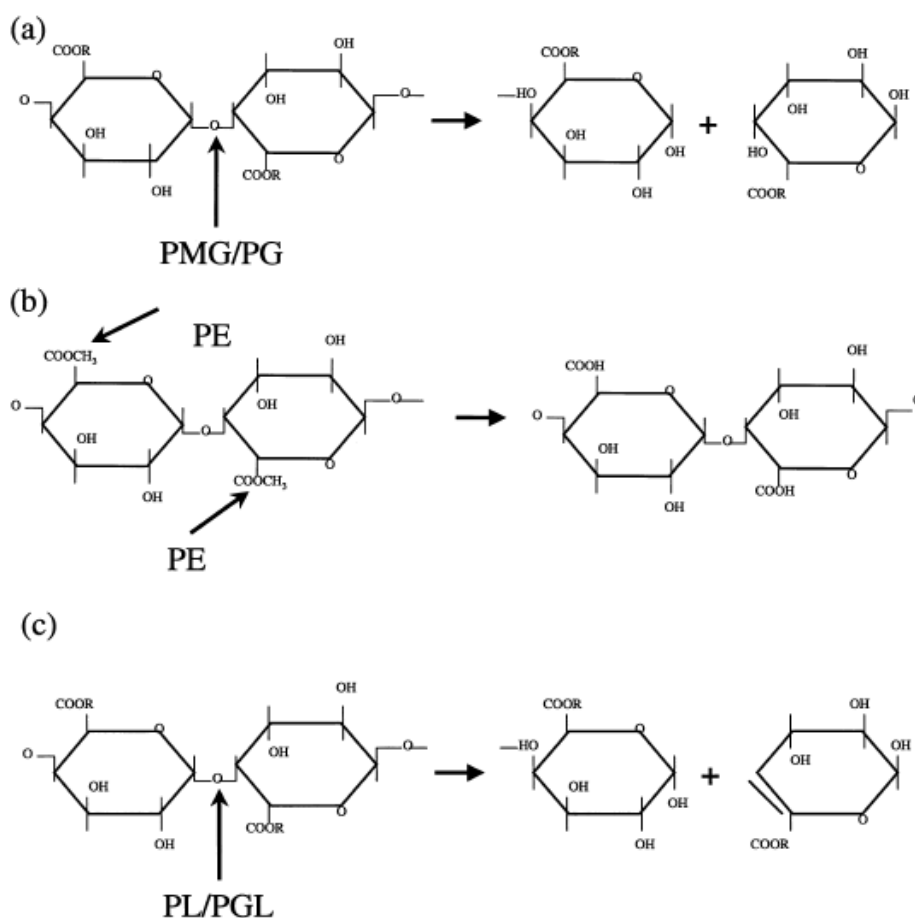


Figura 4. Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação sobre substâncias pécicas. (a) R = H para PG e CH₃ para PMG, (b) PE e (c) R = H para PGL e CH₃ para PL. A seta indica o lugar onde as pectinases atuam sobre as substâncias pécicas. PG: poligalacturonase, PMG: polimetilgalacturonase, PE: pectinesterase, PGL: pectato liase, PL: pectina liase (GUMMADI; PANDA, 2003).

A degradação completa da molécula de pectina envolve ainda a ação de enzimas que degradam a cadeia de ramnogalacturonana (RG). As RG hidrolases promovem a hidrólise de ligações internas de RG, liberando oligômeros saturados (MUTTER et al., 1998): as RG ramnohidrolases promovem a clivagem hidrolítica da cadeia de ramnogalacturonana liberando ramnose da extremidade não redutora (MUTTER et al., 1994) e as RG galacturonohidrolases liberam ácido galacturônico da extremidade não redutora da cadeia de ramnogalacturonana via hidrólise (MUTTER et al., 1998). As RG liases promovem a transeliminção de ligações internas de RG entre um resíduo de ramnose e um de galacturonato, liberando um

oligômero com um resíduo insaturado de galacturonato na extremidade não redutora, e um resíduo de ramnose na extremidade redutora do outro oligômero (MUTTER et al., 1996). As RG acetilesterases promovem a hidrólise dos grupos acetil da molécula de ramnogalacturonana (LEEUVEN et al., 1992).

As Xilogalacturonases promovem a clivagem hidrolítica da ligação entre resíduos de galacturonato que possuem cadeia lateral de xilose da molécula de RG, liberando dímeros xilose - ácido galacturônico (VLUGT-BERGMANS, VAN DER et al., 2000).

A primeira aplicação industrial de pectinase foi em 1930 na preparação de vinhos e sucos de frutas (UENOJO et al., 2007). A maioria das enzimas pectinolíticas comerciais são produzidas a partir de fungos, principalmente *Aspergillus niger* (RIBEIRO et al., 2010). Algumas das atuais aplicações das pectinases na indústria estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Aplicações industriais das pectinases.

Aplicações das pectinases	Fonte
Amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos, tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, desengomagem de fibras na indústria têxtil.	HENRIKSSON et al., 1999
Desengomagem de fibras na indústria de papel.	SAWADA et al., 1998; CALAFELL et al., 2005
Nutrição animal.	MURAD; AZZAZ, 2011
Enriquecimento proteico de alimentos infantis, extração de óleos vegetais, no tratamento de efluentes industriais, na redução do amargor excessivo em cascas de frutas cítricas, na restauração do aroma perdido durante secagem de frutas, no melhoramento da textura de frutas e vegetais processados.	HOONDAL et al., 2002; UENOJO et al., 2007
Indústria farmacêutica	CHAMBIN et al., 2006
Elaboração de biofilmes biodegradáveis	HOAGLAND; PARRIS, 1996
Extração de pectina e de sabores e pigmentos a partir de materiais vegetais	SOWBHAGYA; CHITRA, 2010

O mercado mundial de enzimas na indústria de alimentos foi estimado em US\$ 3,3 bilhões em 2010 devendo atingir até 2015 US\$ 4,4 bilhões (DEWAN, 2011). No segmento de alimentos e bebidas, o mercado de enzimas espera atingir cerca de US\$ 1,3 bilhões em 2015 tendo como base um valor de US\$ 975 milhões em 2010, com uma taxa de crescimento anual de 5,1% (DEWAN, 2011). No Brasil, a produção enzimática esta destinada a 41% para mercado de detergentes, 26% de alimentos, 8% de rações e 25% de outros setores como, por exemplo, o têxtil. Em 2008, o mercado das enzimas de todos os setores envolvidos no Brasil exportou US\$ 38.251,97 e importou US\$ 91.603,31 (HAUSMANN et al., 2011; SIMOES et al., 2011).

O uso das enzimas nos processos industriais apresenta muitas vantagens já que são naturais, aceleram a maior parte dos processos bioquímicos, de baixo consumo energético, possuem baixa toxicidade e são altamente específicas para determinadas ações. Além disso, são capazes de alterar as características de variados tipos de resíduos sem o uso de altas temperaturas, solventes orgânicos e extremos de pH, oferecendo, ao mesmo tempo, maior especificidade na reação, pureza no produto e redução no impacto ambiental (CHERRY; FIDANTSEF, 2003; MUSSATTO et al., 2007).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA), a indústria de produtos alimentícios e bebidas teve um faturamento de R\$ 431,9 bilhões em 2012, o que corresponde ao 9,5% do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil, dos quais R\$ 20,4 bilhões corresponderam à indústria de derivados de frutas e vegetais (ABIA, 2014). As pectinases são enzimas que contribuem para quase 25% das vendas globais de enzimas alimentares (TARI et al., 2007).

1.3. Fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*

O reino *Fungi* consiste em um grupo de organismos eucarióticos que inclui micro-organismos tais como leveduras e fungos filamentosos. Até o momento, foram descritas 72.000 espécies de fungos, porém estima-se que haja pelo menos 1,5 milhões de espécies no mundo (HAWKSWORTH, 2001), ou seja, apenas cerca de

5% da diversidade estimada é conhecida. O reino divide-se nos Filos *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Deuteromycota*. O Filo *Ascomycota* é constituído por 32,200 espécies distribuídas em diversos ambientes terrestres e aquáticos (LEITE, 2010). Podem se apresentar na forma leveduriforme ou micelial com micélios septados. Sua reprodução pode ser assexual ou sexual. A reprodução assexual acontece por gemação, fissão, fragmentação ou formação de clamidósporos ou conídios. Para que aconteça a reprodução sexual é necessário que dois núcleos compatíveis se unam.

O crescimento e as distintas atividades metabólicas dos organismos são uma resposta às condições do meio ambiente físico-químico que os rodeia. Os fungos, como todo organismo vivo, podem modificar seu ambiente e utilizar os compostos químicos presentes no meio como fonte de energia e como elementos básicos para seu crescimento e reprodução, o que permite sua ubiquidade. Na natureza, existe uma grande abundância de polímeros que podem ser aproveitados pelos fungos como fonte nutricional, principalmente resíduos de origem vegetal, onde a biodegradação destes constitui um dos mais importantes ciclos do carbono na natureza. Durante a decomposição, os componentes dos materiais lignocelulósicos são progressivamente despolimerizados e, finalmente, transformados em dióxido de carbono e água, fechando o ciclo do carbono que se iniciou na fotossíntese realizada pela célula vegetal quando ainda ativa (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010).

A forma de nutrição dos fungos é absorptiva, ou seja, são capazes de incorporar moléculas pequenas no interior do seu organismo, as quais utilizam como fonte de matéria e energia para seu crescimento. Para isso se faz necessária a secreção de sistemas enzimáticos ao meio que possam degradar macromoléculas como polissacarídeos, a moléculas de menor tamanho. A produção e liberação das enzimas no meio esta sujeita a mecanismos de regulação e síntese. Estas não são produzidas de modo constante, sendo sua síntese induzida pelo substrato adequado, além de ser reprimida por açúcares como a glicose (FERRAZ, 2010; GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010).

Aspergillus (*Eurotiales*; *Trichocomaceae*) é um gênero amplamente distribuído com mais de 250 espécies de fungos filamentosos, grande parte saprófitas, pertencentes ao filo *Ascomycota* (ROKAS, 2013) e distribuídas em cinco seções denominadas de *Nigri*, *Flavi*, *Circumdati*, *Cremeri* e *Candidi* (MACHIDA; GOMI, 2010). Algumas espécies de *Aspergillus* produzem, regularmente, os dois tipos de esporos, sexuais e assexuais; em outras espécies a forma sexual é rara e para outras espécies os esporos sexuais nunca foram descritos (MACHIDA; GOMI, 2010). A Seção *Flavi* contém potentes produtores de micotoxinas bem como estirpes produtoras de metabolitos usados na indústria alimentícia. A espécie *A. oryzae* junto com *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. sojae* pertencem a esta seção (YU et al., 2004).

O fungo filamentoso *A. oryzae* (Figura 5) foi isolado pela primeira vez a partir de *koji* por H. Ahlburd em 1876 e identificado como *Eurotium oryzae* sendo mais tarde renomeado *A. oryzae* por F. Cohn (MACHIDA et al., 2008).

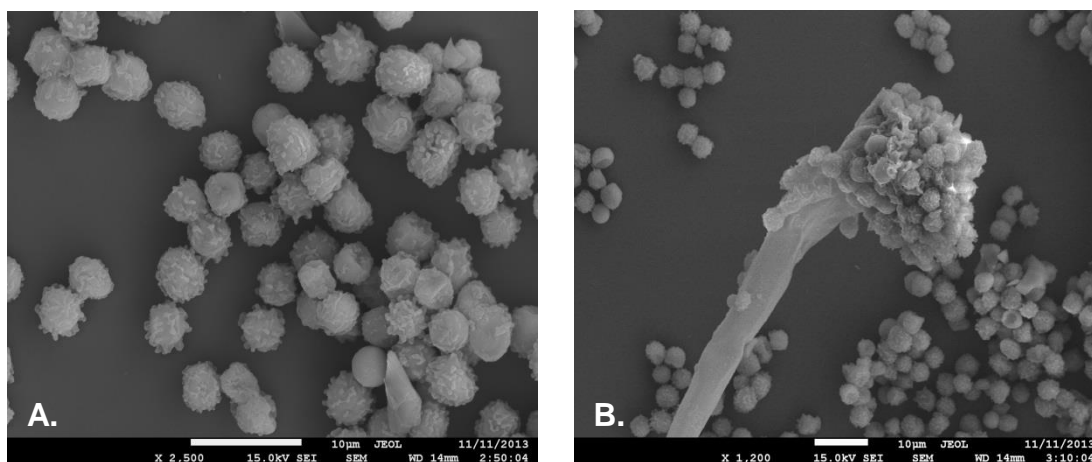


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura do fungo *A. oryzae* (A. Esporos - aumento 2500x; B. Conídio - aumento 1200x).

As micotoxinas, toxinas de origem fúngica, são metabólitos secundários definidos como “produtos naturais produzidos por fungos que evocam uma resposta tóxica quando introduzidos em baixa concentração em vertebrados superiores e outros animais por rotas naturais tais como ingestão, contato com a pele, inalação ou rotas não naturais como injeção por meio de agulhas” (BENNETT, 1987). Pela propriedade de produzir baixos níveis de algumas micotoxinas sob algumas

condições propícias de fermentação ou estresse que propiciem a síntese desses compostos (OLEMPSKA-BEER et al., 2006), o *A. oryzae* apresenta o “status GRAS” (*Generally Regarded As Safe*) outorgado pela FDA (*Food and Drug Administration*) (ABE et al., 2006) que permite o uso de seus metabolitos na fabricação de alimentos humanos e animais. A utilização de *A. Oryzae* também tem o aval da Organização Mundial da Saúde (OMS) (FAO WHO, 1987).

Alguns dos metabolitos secundários produzidos pelo fungo *A. oryzae* que podem ser tóxicos para os seres humanos e animais são: aspergillomarasmina, ácido ciclopiazônico (CPA), ácido kójico, maltorizina, ácido 3-nitropropiónico e violaceína. A presença destes compostos deve ser avaliada cuidadosamente com base no conhecimento da taxonomia, bioquímica e genética (BLUMENTHAL, 2004).

O genoma do *A. oryzae* RIB40 (ATCC – 42149) foi completamente sequenciado e analisado por Machida e colaboradores (2005) consistindo em oito cromossomos com um tamanho de 37,6 Mb, sendo este maior, aproximadamente 34% e 29%, quando comparado com o genoma do *A. fumigatus* e *A. nidulans*, respectivamente.

Devido ao histórico uso como fonte segura de enzimas nativas e um comprovado crescimento em condições de produção industrial, os fungos *A. oryzae* e *A. sojae*, chamados de *mofos koji*, têm sido amplamente utilizados na produção de alimentos fermentados da culinária asiática por mais de mil anos. Alguns dos produtos elaborados a partir dos seus metabolitos são o sake (vinho de arroz), *shochu* (bebida fermentada), *shoyu* (molho de soja), *miso* (pasta de soja), *tofu*, temperos e vinagre (ABE et al., 2006).

Diversos estudos tem demonstrado a aplicação do fungo *A. oryzae* na produção de diferentes enzimas a partir da utilização de subprodutos como é o caso de proteases produzidas no farelo de arroz (CHUTMANOP et al., 2008), de pectinases produzidas em tangerina, laranja, limão-taiti e casca de limão doce (DARTORA et al., 2002). Este também está sendo utilizado na produção de cutinases para a biodegradação de plástico quando cultivado em polibutileno de

succinato (PBS) e succinato de polibutileno co-adipato (PBSA) como fonte de carbono (MAEDA et al., 2005), no tratamento de efluentes da indústria têxtil promovendo descoloração e a diminuição da toxicidade de corantes têxteis reativos (CORSO; ALMEIDA, 2009), na produção de lipases (OHNISHI et al., 1994), de glutaminase (YANO et al., 1988) e na biorremediação de solos contaminados com inseticidas (BHALERAO; PURANIK, 2009).

1.4. Maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg)

O maracujá é um fruto que pertence à família das Passifloraceas, da ordem *Passiflorales*, originário da América Tropical, possuindo 150 espécies utilizadas para diversas finalidades, desde alimentícias, medicinais até ornamentais. As espécies mais cultivadas no Brasil e no mundo são o maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener), maracujá-roxo (*Passiflora edulis*) e maracujá-doce (*Passiflora alata*). Seu nome é de origem indígena das tribos Tupi e Guarani, e deriva de *murukuia*, que significa “alimento em forma de cuia” (PIRES et al., 2011).

O Brasil é o principal produtor mundial de maracujá, com uma produção anual de 776.097 toneladas em 2012 (IBGE, 2012), sendo a região nordeste o mais importante polo produtor do país produzindo 563.346 toneladas (72,59%) em 44.932 hectares (IBGE, 2012) (Figura 6).

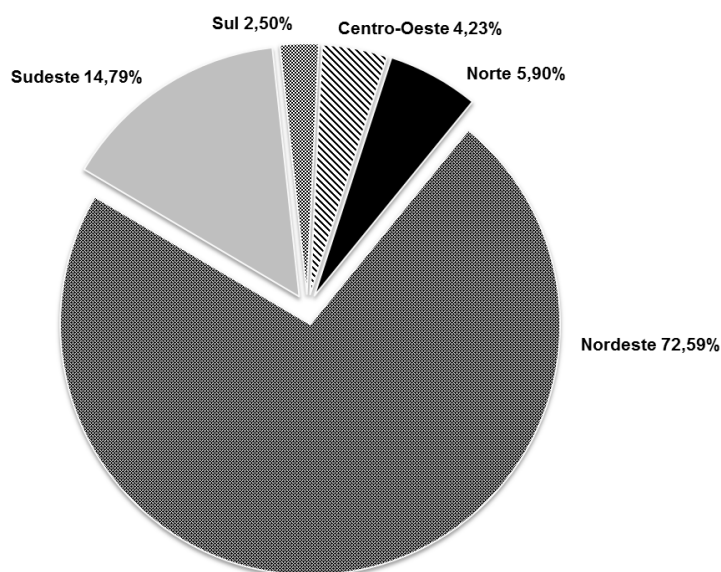


Figura 6. Produção nacional de maracujá-amarelo (IBGE, 2012).

A exportação de maracujá ainda é incipiente. Tem ocorrido em pequena escala, sob as formas de fruta fresca, e, principalmente, suco concentrado. Os principais destinos são os países europeus. A participação da fruta fresca no total das exportações de maracujá do Brasil tem sido restringido a 1,5%, porque o mercado interno absorve quase a totalidade da produção. O suco concentrado representa a maior parcela da exportação sendo atualmente comercializado na Holanda, Estados Unidos, Porto Rico, Japão e Alemanha, os quais importam 76% do suco concentrado produzido no Brasil (MELETTI, 2011).

O seu principal uso está na alimentação na forma de sucos, doces, geléias, sorvetes e licores. Além disso, a literatura etnofarmacológica registra sua indicação como tranquilizante suave, diurético, analgésico, no combate à insônia, às convulsões, às contrações musculares e a doenças inflamatórias da pele (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005; CONCEIÇÃO; ARAÚJO, 2011).

O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa* Deg) (Figura 7), também conhecido como “maracujá-azedo”, é originário do Brasil (ANDERSEN; ANDERSEN, 1989) e cultivado em quase todo o território nacional. O Brasil é um importante produtor mundial de maracujá-amarelo, sendo essa cultura típica de

regiões tropicais, com condições climáticas adequadas ao seu cultivo. Embora a espécie *P. edulis* seja nativa do Brasil, seu cultivo só adquiriu expressão econômica na década de 1980, com o incentivo da agroindústria de sucos e, principalmente, devido à crescente demanda no mercado da fruta fresca (MELETTI, 2011).



Figura 7. Frutos de maracujá-amarelo (MELETTI, 2011)

Em termos nutricionais, o maracujá apresenta excelentes qualidades nutritivas, sendo rico em minerais e vitaminas, principalmente A e C, alcaloides indólicos, flavonoides, esteróis, lignanos e carotenoides (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005). O fruto do maracujá *in natura* é composto pela casca (aproximadamente 50,3%), pelo suco (23,2%) e pelas sementes (26,2%) (FERRARI et al., 2004).

A casca do maracujá corresponde entre o 40 e 50% do peso total dos frutos (OLIVEIRA et al., 2002; MACHADO et al., 2003) sendo rica em fibras solúveis, principalmente pectina (11 – 18%) (D’ADDOSIO et al., 2005; YAPO; KOFFI, 2006) niacina (vitamina B3), ferro, cálcio, magnésio, sódio e fósforo (Tabela 3) (D’ADDOSIO et al., 2005; GONDIM et al., 2005).

Tabela 3. Composição centesimal e de minerais de cascas *in natura* de maracujá-amarelo (*P. edulis fo. flavicarpa*) (GONDIM et al., 2005).

Parâmetros	Quantidades em 100 g de cascas
Cálcio (mg)	44,51
Calorias (Kcal)	29,91
Carboidratos (g)	6,78
Cinzas (g)	0,57
Cobre (mg)	0,04
Ferro (mg)	0,89
Fibras (g)	4,33
Lipídeos (g)	0,01
Magnésio (mg)	27,82
Potássio (mg)	178,40
Proteínas (g)	0,67
Sódio (mg)	43,77
Umidade (g)	87,64
Zinco (mg)	0,32

Alguns dos destinos dos resíduos gerados a partir da elaboração de produtos a base de maracujá são a suplementação da ração animal de aves e bovinos (OTAGAKI; MATSUMOTO, 1958; TOGASHI et al., 2007), substrato para produção de diversas enzimas (CROTTI et al., 1999; SILVA et al., 2005; ZILLY et al., 2012), matéria prima para elaboração de doces (OLIVEIRA et al., 2002) e biscoitos (ISHIMOTO et al., 2007), em silagem (CRUZ et al., 2010), na produção de pectina (D'ADDOSIO et al., 2005; KLIEMANN et al., 2009) e em biorremediação (JACQUES et al., 2007). A farinha produzida a partir da casca tem atividades hipoglicemiantes e hipolipemiantes em humanos (RAMOS et al., 2007) e seu consumo não apresenta risco à saúde (MEDEIROS et al., 2009). Ichimura e colaboradores (2006) demonstraram o efeito anti-hipertensivo do extrato metanólico da casca de *P. edulis* em ratos naturalmente hipertensos.

1.5. Biopurga (*BioScouring*)

O algodão é a forma mais pura de celulose encontrada na natureza, sendo uma fibra de origem vegetal proveniente de espécies pertencentes ao gênero *Gossypium* (SHORE, 1995). É cultivado em países com climas subtropicais tais como Ásia, África, Egito, Índia e Américas do Norte e do Sul.

As fibras de algodão consistem principalmente de longas cadeias de moléculas celulósicas de alto peso molecular e são polimerizadas a partir de monômeros de β -D-glicose (NIAZ et al., 2011). Do ponto de vista estrutural, as fibras de algodão são constituídas por cutícula, parede primária, parede secundária e lúmen, como estão representados na Figura 8 (LEWIN, 2006).

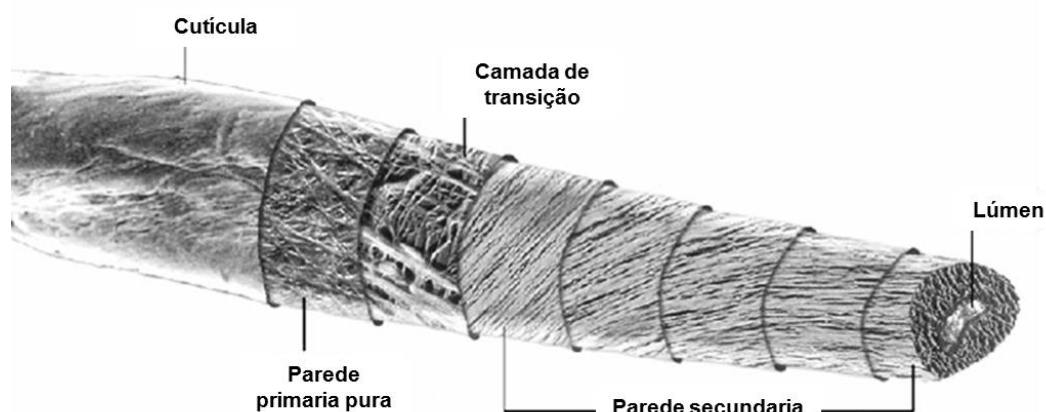


Figura 8. Representação esquemática da estrutura morfológica da fibra de algodão (LEWIN, 2006).

A parede celular vegetal primária é rica em celulose, xiloglucanos, pectinas, ceras, corantes naturais e minerais. Esta representa 2,5% do peso total da fibra e é a responsável pela sua hidrofobicidade. A parede secundária é a parte principal da fibra constituída principalmente de celulose e representa 91,5% do peso total da fibra com um índice de cristalinidade de 70%. As duas paredes apresentam diferentes graus de cristalinidade como também diferentes orientações nas cadeias moleculares. O lúmen é a parte mais interna da fibra do algodão sendo composta de resíduos de protoplastos (LI; HARDIN, 1998; HOONDAL et al., 2002).

A maior parte dos sais de ácidos pécnicos e pectatos, presentes nas fibras, são insolúveis em água e responsáveis pela ligação entre ceras e proteínas formando a barreira protetora da fibra. A quantidade e a composição dessa barreira variam de acordo com as condições de crescimento, fatores climáticos e a variedade do algodão (HOONDAL et al., 2002).

A cutícula é a parte mais externa da fibra constituída por ceras, gorduras, lignina, proteínas e pectinas e é responsável pelas propriedades hidrofóbicas das fibras no seu estado natural ajudando a proteger a parte externa da fibra. A composição química do algodão está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Composição aproximada do algodão (LEWIN, 2006).

Constituinte	Composição (% peso seco)	
	Quantidade típica (%)	Faixa (%)
Celulose	95,0	88,0 - 96,0
Proteína (%N)	1,3	1,1 - 1,9
Substâncias pécnicas	0,9	0,7 - 1,2
Cinzas	1,2	0,7 - 1,6
Cera	0,6	0,4 - 1,0
Açúcares totais	0,3	0,1 - 1,0
Ácidos orgânicos	0,8	0,5 - 1,0
Pigmentos	Traços	-
Outros	1,4	-

Antes do tecido de algodão cru ser tingido em processos úmidos, ele deve ser limpo a fim de torná-lo hidrofílico. O método industrial convencional inclui um tratamento com hidróxido de sódio a altas temperaturas seguido de uma extensiva lavagem. Neste processo, constituintes hidrofóbicos (ceras e gorduras) e outros compostos não celulósicos (pectinas, proteínas e ácidos orgânicos) são saponificados ou degradados até sua solubilidade em água, emulsionados e

dispersos e com isso a superfície das fibras de algodão muda de uma que resiste a umectabilidade pela água por outra que absorve a água rapidamente. O processo de purga alcalina tem como objetivo a produção de um algodão absorvente que logo será tingido para gerar um produto final (Figura 9).

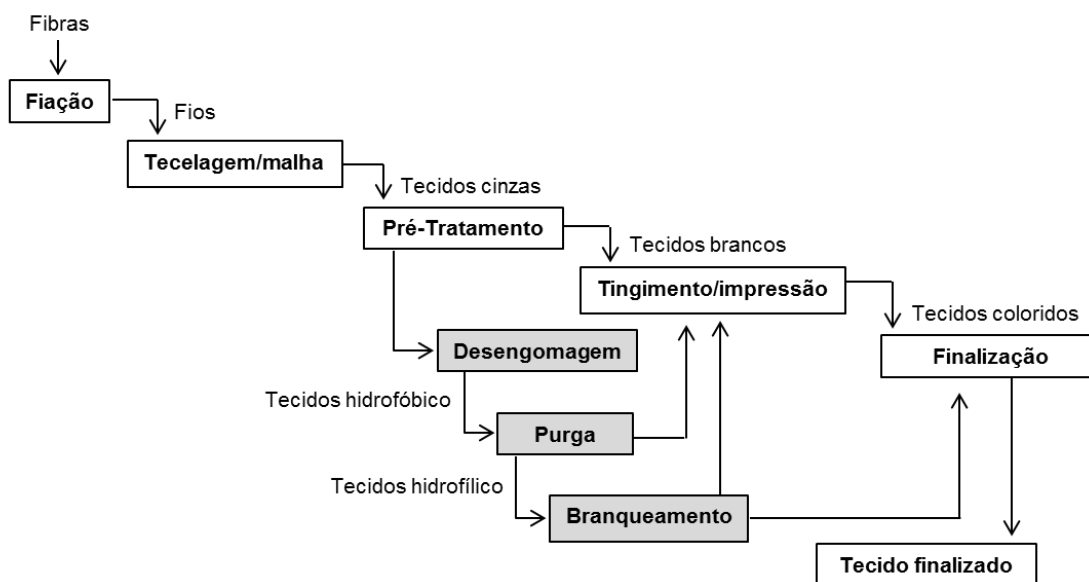


Figura 9. Representação esquemática da cadeia de processamento de algodão, desde a preparação da fibra até o consumidor (Agrawal, 2005).

Geralmente, a purga alcalina é realizada com uma solução diluída de hidróxido de sódio, carbonato de sódio ou peróxido de hidrogênio (1 a 4%) durante 30 a 60 minutos sob condições atmosféricas ou sob pressão a uma temperatura entre 75° e 130°C. Estes produtos químicos não só removem as impurezas como também atacam a celulose, reduzindo a resistência e o peso do tecido de algodão. Além disso, a água residual tem uma alta demanda química e bioquímica de oxigênio (grau DQO e DBO, respectivamente) e sal. Apesar da purga alcalina ser efetiva e o custo do hidróxido de sódio ser baixo, o processo não é ecologicamente viável, pois consome grandes quantidades de energia, água e agentes auxiliares.

As enzimas têm sido utilizadas na indústria têxtil desde o final de 1980. Em 1999 foram incorporadas no processo de purga (NIELSEN et al., 2009). Atualmente existem várias enzimas comerciais produzidas por diversos microrganismos que

atuam em várias etapas do processo da transformação do algodão (KLUG-SANTNER et al., 2006; AGRAWAL et al., 2008; AHLAWAT et al., 2009) (Figura 10).

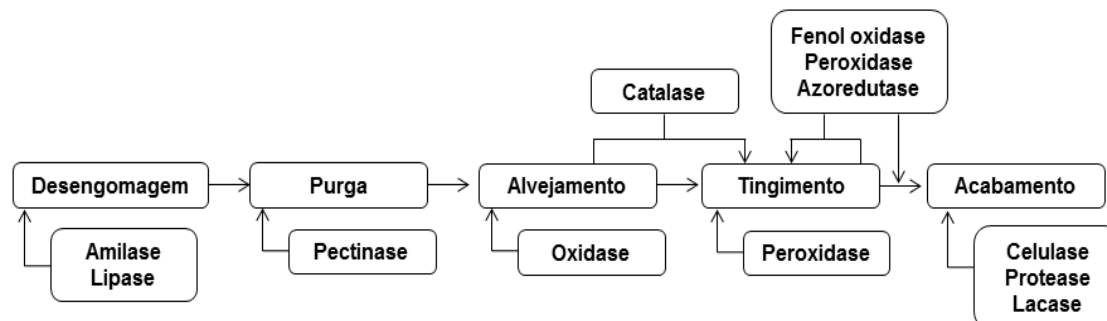


Figura 10. Fluxograma do beneficiamento químico na indústria têxtil e aplicações de enzimas nos processos têxteis (ANDREAUS; CAVACO-PAULO, 2008).

A biopurga refere-se à remoção enzimática de pectinas, ceras, hemiceluloses e sais minerais da superfície das fibras celulósicas do algodão cru. As pectinases quebram a pectina na cutícula do algodão e, assim, ajudam na remoção de ceras, proteínas, óleos e outras impurezas durante a extração (MANGOVSKA et al., 2004).

A pectina está ligada covalentemente à hemicelulose ou celulose ou por ligações de hidrogênio a outros componentes da parede celular. Ou seja, a pectina interage consigo mesma formando pontes transversais que ligam a molécula com outros componentes da parede. Essas ligações são formadas entre blocos de galacturonanas não esterificados ou com pequenas esterificações metílicas com cargas negativas e íons de cálcio com carga positiva por interações eletrostáticas. Isto gera ligações dos grupos hidroxílicos dos polissacarídeos e ligações iônicas com o grupo carboxílico da pectina (LOSONCZI et al., 2005). Consequentemente, a remoção dos íons de cálcio pode acelerar a degradação das substâncias pécnicas. O tensoativo EDTA é o quelante mais eficiente nos processos têxteis (CSISZÁR et al., 2001). Este modifica a estrutura do substrato, removendo os íons de cálcio das pontes transversais (LOSONCZI et al., 2005). Esse processo de remoção do íon cálcio pode levar ao aumento da catálise enzimática, além de proporcionar uma maior mobilidade das cadeias pécnicas e facilitar o ataque das enzimas (CALAFELL et al., 2005). O SDS é um surfactante aniônico que age como detergente que auxilia

na remoção de óleos presentes nas fibras de algodão, facilitando a ação das pectinases. Além disso, mantem a enzima dissolvida, tornando-a disponível para a ação catalítica (AHLAWAT et al., 2009).

O processo de biopurga pode ser feito a temperaturas e pH moderados e no final do processo o algodão apresenta uma estrutura de celulose quase intacta, com menor perda de peso e maior resistência (MANGOVSKA et al., 2004). No processo, vários parâmetros influenciam no resultado do tratamento tais como a concentração da enzima, a temperatura, o pH e a relação do banho e o nível da agitação.

O resultado final deste processo é um tecido/fio com alta capacidade hidrofílica, o qual é necessário para os processos subsequentes, tais como mercerização, alvejamento, tingimento, estamparia e acabamento. Além de pectinases, amilases são usadas na desengomagem (remoção do amido), enquanto que celulases são utilizadas na etapa de remoção de fibrilas da superfície de substratos celulósicos (*bio-polishing*) na etapa de acabamento do produto, tornando os tecidos mais brilhantes e suaves.

O processo de biopurga traz muitas vantagens para o produto final, o meio ambiente e operacional, tais como a diminuição do impacto ambiental, produzindo um efluente mais limpo; a não alteração da estrutura do algodão, permitindo a retenção de suas propriedades naturais da fibra e a diminuição do consumo de água quando comparado com os processos alcalinos. Além disso, a desativação das enzimas envolvidas no processo pode ser feita simplesmente com o aumento da temperatura ou mudança de pH. A biopurga permite trabalhar em condições mais brandas de temperatura, pressão e pH, fornecendo segurança operacional (BUSCHLE-DILLER et al., 1998; HOONDAL et al., 2002; CAVACO-PAULO; GÜBITZ, 2003; MANGOVSKA et al., 2004; MONTEIRO et al., 2009).

1.6. Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas (SMDFA)

Desde sua primeira menção em 1956, o Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas (SMDFA) tem sido utilizado na purificação de proteínas, de componentes celulares e na extração de vírus (FRANCO et al., 2008).

O SMDFA faz parte de um processo de transferência de um soluto de uma fase líquida para outra fase líquida imiscível em contato com a primeira denominada de extração líquido-líquido. Este sistema é constituído primeiramente por moléculas de tensoativos ou surfactantes que tendem a formar micelas oferecendo simultaneamente um ambiente hidrofóbico e outro hidrofílico, o que permite a seletividade na partição das biomoléculas (RANGEL-YAGUI et al., 2003).

Os agentes tensoativos são moléculas anfifílicas compostas de uma porção hidrofílica ou polar, comumente denominada “cabeça polar”, e uma porção hidrofóbica ou apolar, comumente denominada “cauda apolar”. Os tensoativos podem ser classificados em três classes gerais: (a.) iônicos (possuindo cabeça positivamente carregada – catiônicos – ou negativamente carregada – aniônicos), (b.) não-iônicos (possuindo uma cabeça polar capaz de realizar ligações de hidrogênio com a água), e (c.) zwitteriônicos (possuindo uma cabeça caracterizada por um dipolo) (ISRAELACHVILI, 2011).

Os tensoativos em solução aquosa podem exibir diversos tipos de comportamento, dependendo da concentração. Em soluções com concentração de tensoativo abaixo da concentração micelar crítica (CMC), específica para cada tensoativo, as moléculas de tensoativo adsorvem na interface ar-água, projetando suas caudas apolares em direção à fase ar de forma a minimizar o contato com a água e, portanto, diminuindo a tensão existente na interface ar-água. Entretanto, a maioria dos tensoativos apresenta solubilidade mínima na fase aquosa, caracterizada pelo caráter hidrofóbico da cauda apolar. Desta forma, em soluções com concentrações de tensoativo superiores à CMC, as moléculas de tensoativo formam agregados conhecidos como micelas, nas quais as caudas hidrofóbicas se associam no interior minimizando o contato com a água e as cabeças polares

permanecem na periferia da micela maximizando seu contato com a água (TANFORD, 1980; CHEVALIER; ZEMB, 1990) (Figura 11).

As micelas são compostos dinâmicos constituídos de dezenas a milhares de monômeros de agentes tensoativos que estão continuamente e reversivelmente trocando monômeros umas com as outras (Figura 11) (PUVVADA; BLANKSCHTEIN, 1990). A formação de micelas reflete um balanço complexo de várias forças intermoleculares, incluindo interações de van der Waals, eletrostáticas, estéricas, hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio (TANFORD, 1980; ISRAELACHVILI, 2011). A principal força atrativa resulta do efeito hidrofóbico associado às caudas apolares. A força repulsiva contrária é resultado das interações estéricas (existente entre as cabeças hidratadas de tensoativos não-iônicos) e eletrostáticas (existente entre as cabeças possuindo cargas semelhantes) associadas às cabeças hidrofílicas. O processo de micelização é resultado de um balanço entre estas forças atrativas e repulsivas (KAMEI, 2001).

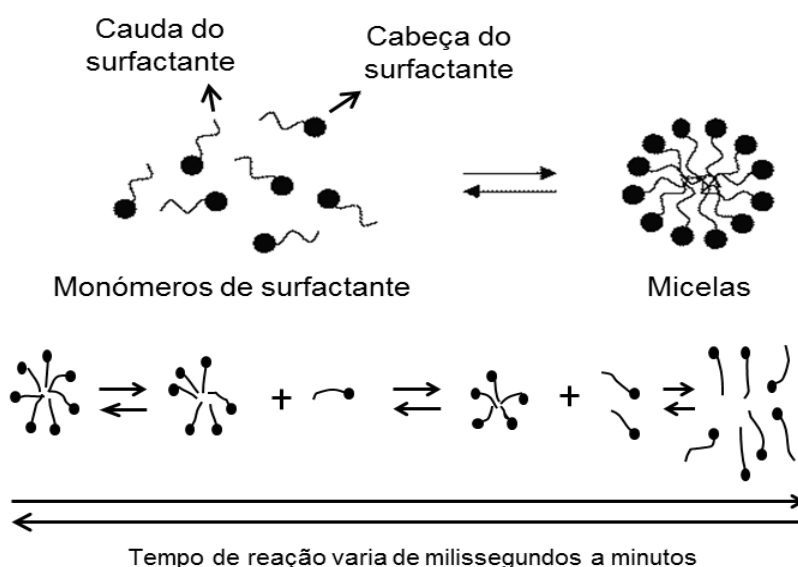


Figura 11. Estrutura geral dos surfactantes no meio hidrofóbico. Os círculos negros representam as cabeças do tensoativo (porções hidrofílicas) e as linhas curvas pretas representam as caudas do tensoativo (porções hidrofóbicas). Há formação de micelas em solução aquosa quando a concentração mínima crítica (CMC) é atingida, ficando as cabeças em contato com a água e as caudas para dentro da micela. Nota-se que, como indicado pelas setas, as micelas e as moléculas de tensoativos que a constituem fazem parte de um equilíbrio termodinâmico reversível (LIU et al., 1996).

Para determinados tensoativos, como o Triton[®] X-114, uma solução micelar isotrópica, homogênea submetida a determinadas condições como aumento de temperatura e adição de sais, por exemplo, pode espontaneamente se separar em duas fases líquidas aquosas e imiscíveis (Figura 12). Como a concentração de tensoativos nas duas fases é superior à CMC, micelas estão presentes em ambas as fases. Porém, o tamanho médio e o grau de polidispersão das micelas são diferentes nas duas fases, pois a concentração de tensoativo é diferente (LIU et al., 1998). Em uma das fases, denominada de “regime diluído” ou “pobre em micelas”, as micelas encontram-se isoladas umas das outras em solução. Nesta fase, o elevado teor de água, 75 a 80% em massa, das fases formadas garante a conservação das propriedades biológicas das biomoléculas de interesse (FRANCO et al., 2008). Na outra, denominada de “regime semi-diluído ou concentrado” ou “rico em micelas” as micelas apresentam-se enoveladas formando uma rede. A distinção neste ambiente físico-químico das duas fases formadas consiste na base da utilização destes sistemas em processos de extração de materiais biológicos (LIU et al., 1996; KAMEI et al., 2002).

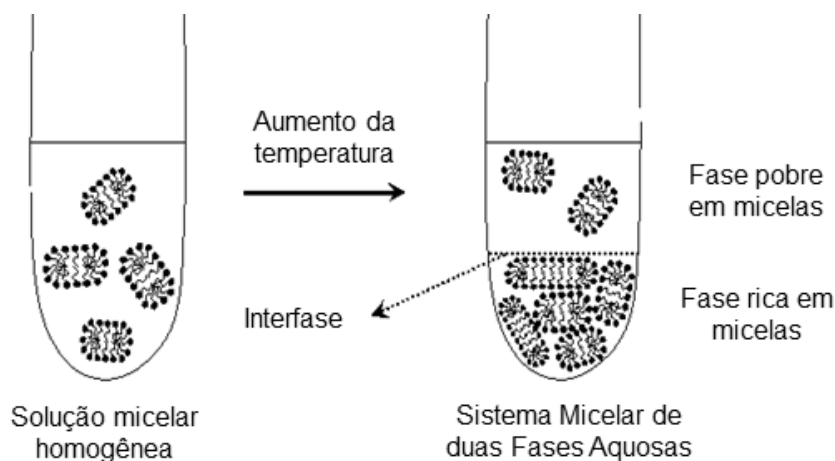


Figura 12. Representação esquemática da separação de fases em um sistema micelar aquoso utilizando Triton[®] X-114 com o aumento da temperatura. A solução micelar tem uma única fase em temperaturas baixas e se separa com o aumento da temperatura, ficando uma na parte superior (fase pobre em micelas) e uma fase na parte inferior (fase rica em micelas) (LIU et al., 1996).

O fenômeno de separação de fases pode ser representado por uma curva em forma de sino, denominada de “curva binodal” ou “curva de coexistência”, com

concauidade para cima ou para baixo dependendo da separação de fases ser induzida pelo aumento ou diminuição da temperatura, respectivamente. A curva binodal, desta forma, representa o limite, em função da temperatura e da concentração de tensoativo, no qual a solução micelar se separa em duas fases macroscópicas (NIKAS et al., 1992). A temperatura na qual há uma separação das duas fases é conhecida como ponto-de-névoa (*cloud point*). Esta temperatura é extremadamente sensível à interação no sistema e depende da estrutura, do peso molecular e da concentração do polímero e da presença de outros solutos não formadores de fases (RAGHAVARAO et al., 2003).

A partição de proteínas pelo SMDFA depende principalmente das propriedades físicas e químicas como ponto isoelétrico, a superfície de hidrofobicidade, massa molar e as características do meio tal como o tipo de surfactante ou polímero, a sua concentração, pH e a concentração e tipo de sal e da temperatura (RAGHAVARAO et al., 2003; MAZZOLA et al., 2008). A fase de separação de cada sistema muda de acordo com o polímero (peso molecular e concentração) e à quantidade e concentração de sal presente no sistema. Por isso, ter conhecimento da curva bimodal é essencial quando se trabalha com o SMDFA.

Este método oferece algumas vantagens de versatilidade, curta fase de separação, eficiência, segura para o meio ambiente em comparação com os métodos convencionais, baixo custo e facilidade de aplicação a larga escala, não emprega compostos orgânicos voláteis como solventes e em alguns casos, permite a reciclagem dos surfactantes, sendo posteriormente utilizados em outra separação. Na área de biotecnologia tem sido sugerido no lugar ou como processo complementar a cromatografias para reduzir o custo do processamento de muitos produtos biológicos (MINUTH et al., 1995; RAGHAVARAO et al., 2003; ROSA et al., 2013).

Em 1981, Bordier fez o primeiro trabalho demonstrando a possibilidade de separar proteínas por extração em sistemas de duas fases aquosas com o auxílio de agentes tensoativos não-íonicos como o Triton[®] X-114 (octilfenoxi polietoxietanol) (Figura 13) a 4°C, o qual ajuda a preservar a integridade das moléculas. Nesse tipo

de sistema, as proteínas hidrofílicas foram encontradas exclusivamente na fase pobre em micelas (fase inferior do sistema de duas fases aquosas micelares), enquanto que as proteínas com caráter hidrofóbico na fase rica em micelas (fase superior do sistema).

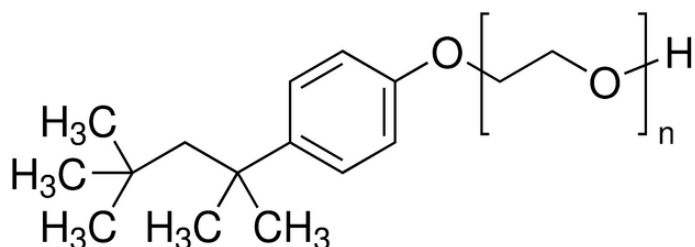


Figura 13. Molécula do surfactante octilfenoxi polietoxietanol não-iônico (Triton[®] X-114) (SIGMA-ALDRICH)

Diversas pesquisas têm sido realizadas usando o Triton[®] X-114 no SMDFA na purificação de diferentes proteínas (BORDIER, 1981; HOLM et al., 1986; SÁNCHEZ-FERRER et al., 1990, 1994; LIU et al., 1996; BECKER et al., 2009). O seu uso apresenta várias vantagens como simplicidade na sua manipulação, a reprodutibilidade dos resultados obtidos, a manutenção da atividade biológica das moléculas e a possibilidade de trabalhar em larga escala (PRYDE, 1986).

2. Justificativa

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá, sendo a região nordeste a principal produtora do país (IBGE, 2012). Com isso, são gerados vários tipos de resíduos agroindustriais tais como cascas que podem ser utilizados em vários processos industriais tais como na produção de farinha para ração animal e na produção de enzimas além das propriedades hipoglicemiantes e hipolipemiantes em humanos (RAMOS et al., 2007), diminuindo o impacto ambiental gerado pelo descarte inapropriado deste tipo de resíduos.

As pectinases constituem um grupo de enzimas que catalisam a degradação das substâncias pécicas presentes no material vegetal. Estas enzimas são comuns na natureza, sendo produzidas por bactérias, fungos, leveduras, insetos, nemátodos, protozoários e plantas e podem ser utilizadas em uma grande variedade de processos industriais. Estudos prévios indicam que o fungo *A. oryzae* (BLU-37), isolado de resíduos de algodão da indústria têxtil, é um eficiente produtor de pectinases (SIQUEIRA et al., 2010). O fungo *A. oryzae* tem sido bastante estudado na produção de diversas enzimas quando crescido em diversos substratos além da importância na alimentação asiática devido a seu “status GRAS” (*Generally Regarded As Safe*) outorgado pela FDA (*Food and Drug Administration*) e ao aval da Organização Mundial da Saúde (OMS) o que permite uso de seus metabolitos em diversos processos industriais, sem afetar a saúde humana nem animal.

A viabilidade da comercialização e da produção em escala industrial de enzimas obtidas por meio da biotecnologia depende significativamente das técnicas empregadas na purificação destas. A baixa concentração inicial dos produtos obtidos, sensibilidade térmica e a necessidade de preservar as principais propriedades dos compostos tornam os processos de recuperação onerosos para os custos globais de produção. Desenvolver técnicas de purificação eficientes, minimizando o número de etapas necessárias para a recuperação desejada, é uma das preocupações atuais na área da biotecnologia, pois isto significa redução de custos bem como de perdas do produto (HUENUPI et al., 1999). A extração líquido-líquido pelo sistema micelar de duas fases aquosas é uma operação unitária que

pode oferecer as vantagens necessárias para a produção de um bioproduto com essas características.

3. Objetivos

- Produzir, purificar parcialmente e caracterizar pectinases produzidas pelo fungo *A. oryzae* cultivado em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono em meio submerso.
- Clarificar o extrato bruto concentrado obtido a partir do cultivo do fungo *A. oryzae* em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono utilizando um sistema micelar de duas fases aquosas.
- Comparar os efeitos do extrato bruto concentrado de *A. oryzae* quando crescido em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono com outras enzimas de origem comercial, com e sem produtos auxiliares, no processo de biopurga da indústria têxtil.

Referências bibliográficas

- ABE, K.; GOMI, K.; HASEGAWA, F.; MACHIDA, M. Improved pectinase production in *Penicillium griseoroseum* recombinant strains. **Mycopathologia**, v. 162, n. 3, p. 143–153, 2006.
- ABIA. www.abia.org.br. Disponível em: <www.abia.org.br>. Acesso em: 15/1/2014.
- AGRAWAL, P. B.; NIERSTRASZ, V. A.; BOUWHUIS, G. H.; WARMOESKERKEN, M. M. C. G. Cutinase and pectinase in cotton bioscouring: an innovative and fast bioscouring process. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 5, p. 412–421, 2008.
- AHLAWAT, S.; DHIMAN, S. S.; BATTAN, B.; MANDHAN, R. P.; SHARMA, J. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 521–526, 2009.
- ALAÑA, A.; FERRER, J. L. S.; FONTAL, M. J. L.; ALKORTA, I. Aplicación industrial de los enzimas pécticos: producción, purificación, inmovilización y algunas propiedades de la pectina liasa de *Penicillium italicum*. **Alimentación, equipos y tecnología**, v. 11, n. 8, p. 127–134, 1992.
- ANDERSEN, O.; ANDERSEN, V. U. **As frutas silvestres brasileiras**. Globo Rural, 1989.
- ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A. Enzimas no Processamento de Fibras Têxteis. In: E. P. S. Bon; M. A. Ferrara; M. L. Corvo (Eds.); **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. p.179–204, 2008. Rio de Janeiro: Interciência.
- BECKER, J. S.; THOMAS, O. R. T.; FRANZREB, M. Protein separation with magnetic adsorbents in micellar aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 65, n. 1, p. 46–53, 2009.
- BENNETT, J. W. More solutions to Sticky Problems: a guide to getting more from your Brookfield Viscometer. **Mycopathologia**, v. 100, n. 1, p. 3–5, 1987.
- BHALERAO, T. S.; PURANIK, P. R. Microbial degradation of monocrotophos by *Aspergillus oryzae*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 4, p. 503–508, 2009.
- BLUMENTHAL, C. Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 39, n. 2, p. 214–228, 2004.

BON, E. P. S.; PEREIRA-JR, N.; GOTTSCHALK, L. M. F.; et al. Bioprocessos para produção de enzimas. In: E. P. da S. Bon (Ed.); **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**, 2008. Rio de Janeiro: Interciência.

BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **The Journal of biological chemistry**, v. 256, n. 4, p. 1604–7, 1981.

BUSCHLE-DILLER, G.; MOGAHZY, Y. EL; INGLESBY, M. K.; ZERONIAN, S. H. Effects of Scouring with Enzymes, Organic Solvents, and Caustic Soda on the Properties of Hydrogen Peroxide Bleached Cotton Yarn. **Textile Research Journal**, v. 68, n. 12, p. 920–929, 1998.

CALAFELL, M.; GUEBITZ, G.; GARRIGA, P. Dyeing behaviour of cotton fabric bioscoured with pectate lyase and polygalacturonase. **Coloration Technology**, v. 121, p. 291–297, 2005.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. DE P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012.

CAVACO-PAULO, A.; GÜBITZ, G. Catalysis and Processing. In: A. CAVACO-PAULO; G. GÜBITZ (Eds.); **Textile Processing with Enzymes**. p.86–119, 2003. Cambridge: CRC Press.

CHAMBIN, O.; DUPUIS, G.; CHAMPION, D.; VOILLEY, A.; POURCELOT, Y. Colon-specific drug delivery: Influence of solution reticulation properties upon pectin beads performance. **International journal of pharmaceutics**, v. 321, n. 1-2, p. 86–93, 2006.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 438–443, 2003.

CHEVALIER, Y.; ZEMB, T. The structure of micelles and microemulsions. **Reports on Progress in Physics**, v. 53, p. 279–371, 1990.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y.; SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 7, p. 1012–1018, 2008.

COLLMER, A.; RIED, J. L.; MOUNT, M. S. A. Assay methods for pectic enzymes. **Methods in enzymology**, v. 161, p. 329–335, 1988.

CONCEIÇÃO, A. O. DA; ARAÚJO, L. M. Maracujá: etnofarmacologia e ciência. In: M. M. Pires; A. R. são José; A. O. Conceição (Eds.); **Maracujá: avanços tecnológicos e sustentabilidade**. p.69–80, 2011. Ilhéus - BA: UESC.

CORSO, C. R.; ALMEIDA, A. C. M. DE. Bioremediation of dyes in textile effluents by *Aspergillus oryzae*. **Microbial ecology**, v. 57, n. 2, p. 384–90, 2009.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: F. G. Faleiro; N. T. V. Junqueira; M. F. Braga (Eds.); **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. p.677, 2005. Planaltina - DF: Embrapa Cerrados.

CROTTI, L. B.; JABOR, V. A. P.; CHELLEGATTI, M. A. D. S. C.; FONSECA, M. J. V.; SAID, S. Studies of pectic enzymes produced by *Talaromyces flavus* in submerged and solid substrate cultures. **Journal of basic microbiology**, v. 39, n. 4, p. 227–35, 1999.

CRUZ, B. C. C. DA; SANTOS-CRUZ, C. L. DOS; PIRES, A. J. V; et al. Composição bromatológica da silagem de capim-elefante com diferentes proporções de casca desidratada de maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*) Chemical composition of elephant grass silage with different proportions of dried passion fruit peel. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 3, p. 434–440, 2010.

CSISZÁR, E.; LOSONCZI, A.; SZAKÁCS, G.; et al. Enzymes and chelating agent in cotton pretreatment. **Journal of biotechnology**, v. 89, n. 2-3, p. 271–9, 2001.

D'ADDOSIO, R.; PÁEZ, G.; MARÍN, M.; MÁRMOL, Z.; FERRER, J. Obtención y caracterización de pectina a partir de la cáscara de parchita (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener). **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 22, p. 240–249, 2005.

DARTORA, A. B.; BERTOLIN, T. E.; BILIBIO, D.; SILVEIRA, M. M.; COSTA, J. A. V. Evaluation of filamentous fungi and inducers for the production of endopolygalacturonase by solid state fermentation. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 57, n. 7-8, p. 666–70, 2002.

DEWAN, S. S. Enzymes in Industrial Applications: Global Markets. **Bcc Research**, , n. January, 2011.

FAO WHO. **Report 31: Evaluation of certain food additives and contaminants**. Geneva, 1987.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá-aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 101–102, 2004.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: E. ESPOSITO; J. L. AZEVEDO (Eds.); **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Segunda ed., p.215–245, 2010. Caxias do Sul: EDUCS.

FRANCO, T. T.; KILIKIAN, B. V.; COIMBRA, J. S. R.; MEIRELLES, A. J. A. Extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas. In: B. V. Kilikian; A. Pessoa-Jr (Eds.); **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. 1st ed., p.114–166, 2008. Barueri, SP: Editora Manole.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: E. ESPOSITO; J. L. AZEVEDO (Eds.); **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Segunda ed., p.125–173, 2010. Caxias do Sul: EDUCS.

GONDIM, J. A. M.; MOURA, M. D. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 825–827, 2005.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 987–996, 2003.

HAUSMANN, R.; HIDALGO, C. A. C.; BUSTOS, S.; et al. **The Atlas of Economic Complexity**. Cambridge MA.: Puritan Press, 2011.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1422–1432, 2001.

HENRIKSSON, G.; AKIN, D. E.; SLOMCZYNSKI, D.; ERIKSSON, K.-E. L. Production of highly efficient enzymes for flax retting by *Rhizomucor pusillus*. **Journal of biotechnology**, v. 68, p. 115–123, 1999.

HEREDIA, A.; JIMÉNEZ, A.; GUILLÉN, R. Composition of plant cell walls. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 200, p. 24–31, 1995.

HOAGLAND, P. D.; PARRIS, N. Chitosan/Pectin Laminated Films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 8561, n. 95, p. 1915–1919, 1996.

HOLM, C.; FREDRIKSON, G.; BELFRAGE, P. Demonstration of the Amphiphilic Character of Hormone-sensitive Lipase by Temperature-induced Phase Separation in Triton X- 114 and charge-shift electrophoresis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 33, p. 15659–15661, 1986.

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 409–418, 2002.

HUENUPI, E.; GOMEZ, A.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Optimization and design considerations of two-phase continuous protein separation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 263, p. 256–263, 1999.

IBGE. **Produção agrícola Municipal-Culturas temporárias e permanentes**. 39th ed. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012.

ICHIMURA, T.; YAMANAKA, A.; ICHIBA, T.; et al. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 70, n. 3, p. 718–21, 2006.

ISHIMOTO, F. Y.; HARADA, A. I.; BRANCO, I. G.; CONCEIÇÃO, W. A. DOS S.; COUTINHO, M. R. Aproveitamento Alternativo da Casca do Maracujá- Amarelo

(*Passiflora edulis* f. var. *flavicarpa* Deg.) para Produção de Biscoitos. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9, n. 2, p. 279–292, 2007.

ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and surface forces**. Thrid ed. Academic press, 2011.

JACQUES, R. A.; LIMA, E. C.; DIAS, S. L. P.; MAZZOCATO, A. C.; PAVAN, F. A. Yellow passion-fruit shell as biosorbent to remove Cr(III) and Pb(II) from aqueous solution. **Separation and Purification Technology**, v. 57, n. 1, p. 193–198, 2007.

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

KALANTZI, S.; MAMMA, D.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D. Effect of pectinolytic enzymes on the physical properties of caja-manga (*Spondias cytherea* Sonn.) pulp. **Bioresource technology**, v. 99, n. 17, p. 8185–92, 2008.

KAMEI, D. T. **Protein and Viral Partitioning in Two-Phase Aqueous Micellar Systems**, 2001. Massachusetts Institute of Technology.

KAMEI, D. T.; WANG, D. I. C.; BLANKSCHTEIN, D. Fundamental Investigation of Protein Partitioning in Two-Phase Aqueous Mixed (Nonionic/Ionic) Micellar Systems. **Langmuir**, v. 18, p. 3047–3057, 2002.

KASHYAP, D. R.; CHANDRA, S.; KAUL, A.; TEWARI, R. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp . DT7. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 277–282, 2000.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource technology**, v. 77, n. 3, p. 215–27, 2001.

KLIEMANN, E.; SIMAS, K. N. DE; AMANTE, E. R.; et al. Optimisation of pectin acid extraction from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) using response surface methodology. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 3, p. 476–483, 2009.

KLUG-SANTNER, B. G.; SCHNITZHOFER, W.; VRSANSKÁ, M.; et al. Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. **Journal of biotechnology**, v. 121, n. 3, p. 390–401, 2006.

LEEUWEN, M. J. F. S.; BROEK, L. A. M. VAN DEN; SCHOLS, H. A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Rhamnogalacturonan acetylerase: a novel enzyme from *Aspergillus aculeatus*, specific for the deacetylation of hairy (ramified) regions of pectins. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 38, p. 0–2, 1992.

LEITE, C. L. Taxonomia de fungos. In: E. ESPOSITO; J. L. AZEVEDO (Eds.); **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Segunda ed., p.47–91, 2010. Caxias do Sul: EDUCS.

LEROUXEL, O.; CAVALIER, D. M.; LIEPMAN, A. H.; KEEGSTRA, K. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. **Current opinion in plant biology**, v. 9, n. 6, p. 621–30, 2006.

LEWIN, M. **Handbook of Fiber Chemistry**. Third ed. CRC Press, 2006.

LI, Y.; HARDIN, I. R. Enzymatic scouring of cotton: surfactants, agitation, and selection of enzymes. **Textile chemist and colorist**, v. 30, n. 9, p. 23–29, 1998. American Association of Textile Chemists and Colorists.

LIU, C. L.; KAMEI, D. T.; KING, J. A.; WANG, D. I.; BLANKSCHTEIN, D. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, v. 711, n. 1-2, p. 127–38, 1998.

LIU, C. L.; NIKAS, Y. J.; BLANKSCHTEIN, D. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 52, n. 2, p. 185–92, 1996.

LOSONCZI, A.; CSISZÁR, E.; SZAKÁCS, G.; BEZÚR, L. Role of the EDTA Chelating Agent in Bioscouring of Cotton. **Textile Research Journal**, v. 75, n. 5, p. 411–417, 2005.

MACHADO, S. S.; CARDOSO, R. L.; MATSUURA, F. C. A. U.; FOLEGATTI, M. I. S. Caracterização física e físico-química de frutos de maracujá amarelo provenientes da região de Jaguaquara – Bahia. **Revista Magistra**, v. 15, n. 2, 2003.

MACHIDA, M.; ASAI, K.; SANO, M.; et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1157–61, 2005.

MACHIDA, M.; GOMI, K. **Aspergillus: molecular biology and genomics**. Ilustrada ed. Horizon Scientific Press, 2010.

MACHIDA, M.; YAMADA, O.; GOMI, K. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. **DNA research**, v. 15, n. 4, p. 173–83, 2008.

MAEDA, H.; YAMAGATA, Y.; ABE, K.; et al. Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 6, p. 778–88, 2005.

MANGOVSKA, B.; DEMBOVSKI, G.; JORDANOV, I. Structural characteristics of cotton knitted fabrics after enzymatic and alkaline scouring. **Bulletin of the chemists and techologists of Macedonia**, v. 23, n. 1, p. 19–28, 2004.

MAZZOLA, P. G.; LOPES, A. M.; HASMANN, F. A.; et al. Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 143–157, 2008.

MCFEETERS, R. F.; ARMSTRONG, S. A. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Analytical biochemistry**, v. 139, n. 1, p. 212–7, 1984.

MEDEIROS, J. DOS S.; DINIZ, M. M. DE F. F. M.; UBIRAJARA, A.; et al. Ensaios toxicológicos clínicos da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, f. *flavicarpa*), como alimento com propriedade de saúde. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 394–399, 2009.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. especial, p. 83–91, 2011.

MINUTH, T.; THOMMES, J.; KULA, W. R. Extraction of cholesterol oxidase from *Nocardia rhodochrous* using a nonionic surfactant-based aqueous two-phase system. **Journal of biotechnology**, v. 38, p. 151–164, 1995.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, N.; SILVA, R. DO N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9–23, 2009.

MURAD, H. A.; AZZAZ, H. H. Microbial Pectinases and Ruminant Nutrition. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 246–269, 2011.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. **Ciência Hoje**, v. 242, p. 28, 2007.

MUTTER, M.; BELDMAN, G.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Rhamnogalacturonan alfa-L-Rhamnopyranohydrolase: A novel enzyme specific for the terminal nonreducing rhamnosyl unit in rhamnogalacturonan regions of pectin. **Plant Physiology**, v. 106, p. 241–250, 1994.

MUTTER, M.; COLQUHOUN, LAN J.; SCHOLS, H. A.; BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J. Rhamnogalacturonase B from *Aspergillus aculeatus* Is a Rhamnogalacturonan alfa-L-Rhamnopyranosyl-(1-4)-alfa-D-Galactopyranosyluronide Lyase. **Plant Physiology**, v. 110, p. 73–77, 1996.

MUTTER, M.; RENARD, C. M.; BELDMAN, G.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. Mode of action of RG-hydrolase and RG-lyase toward rhamnogalacturonan oligomers. Characterization of degradation products using RG-rhamnohydrolase and RG-galacturonohydrolase. **Carbohydrate research**, v. 311, n. 3, p. 155–64, 1998.

NAIDU, G. N.; PANDA, T. Production of pectolytic enzymes- a review. **Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 355–361, 1998.

NAIAZ, A.; MALIK, Q. J.; MUHAMMAD, S.; SHAMIM, T.; ASGHAR, S. Bioscouring of cellulosic textiles. **Coloration Technology**, v. 127, n. 4, p. 211–216, 2011.

NIELSEN, P. H.; KUILDERD, H.; ZHOU, W.; X. LU. Enzyme biotechnology for sustainable textiles. In: R. S. Blackburn (Ed.); **Sustainable Textil - Life cycle and environmental impact**. primeira ed., 2009. New Delhi, India: Woodhead Publishing Limited.

NIKAS, J.; LIU, C. L.; SRIVASTAVA, T.; ABBOTT, N. L.; BLANKSCHTEIN, D. Protein Partitioning in Two-Phase Aqueous Nonionic Micellar Solutions. **Macromolecules**, v. 25, p. 4797–4806, 1992.

OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; SEKIGUCHI, J. Lipase Production of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 5, p. 490–495, 1994.

OLEMPСКА-BEER, Z. S.; MERKER, R. I.; DITTO, M. D.; DINOVI, M. J. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. **Regulatory toxicology and pharmacology**, v. 45, n. 2, p. 144–158, 2006.

OLIVEIRA, L. F. DE; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. DO N.; RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá (*Passiflora edulis* F. *flavicarpa*) para a produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 259–262, 2002.

OTAGAKI, K. K.; MATSUMOTO, H. Passion Fruit By-Products, Nutritive Values and Utility of Passion Fruit By-Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 54–57, 1958.

PIRES, M. M.; JOSÉ, A. R. S.; CONCEIÇÃO, A. O. **Maracujá: avanços tecnológicos e sustentabilidade**. Ilhéus: Editora UESC, 2011.

PITT, D. Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. **Methods in enzymology**, v. 161, p. 350–354, 1988.

PRYDE, J. G. Triton® X-114: a detergent that has come in from the cold. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 11, n. 8, p. 160–163, 1986.

PUVVADA, S.; BLANKSCHTEIN, D. Molecular-thermodynamic approach to predict micellization, phase behavior and phase separation of micellar solutions. I. Application to nonionic surfactants. **The Journal of Chemical Physics**, v. 92, n. 6, p. 3710, 1990.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; SRINIVAS, N. D.; BARHATE, R. S. Aqueous two phase extraction-an environmentally benign technique. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 5, n. 2, p. 136–141, 2003.

RAMOS, A. T.; CUNHA, M. A. L.; SABAA-SRUR, A. U. O.; et al. Uso de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* na redução do colesterol. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 592–597, 2007. Sociedade Brasileira de Farmacognosia.

RANGEL-YAGUI, C. O.; LAM, H.; KAMEI, D. T.; et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 82, n. 4, p. 445–56, 2003.

REDDY, P. L.; SREERAMULU, A. Isolation, identification and screening of pectinolytic fungi from different soil samples of chittoor district. **International Journal of Life Science Biotechnology and Pharma Research**, v. 1, n. 3, p. 186–193, 2012.

REID, I.; RICARD, M. Pectinase in papermaking: solving retention problems in mechanical pulps bleached with hydrogen peroxide. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, n. 2-4, p. 115–123, 2000.

REXOVÁ-BENKOVÁ, L.; MARKOVIČ, O. Pectic Enzymes. In: R. S. Tipson; D. Horton (Eds.); **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. 33rd ed., v. 33, p.323–385, 1976. Academic Press.

RIBEIRO, D. S.; HENRIQUE, S. M. B.; OLIVEIRA, L. S.; MACEDO, G. A.; FLEURI, L. F. Enzymes in juice processing: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 4, p. 635–641, 2010.

ROKAS, A. *Aspergillus*. **Current biology**, v. 23, n. 5, p. R187–8, 2013.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectic Enzymes. In: A. H. Rose (Ed.); **Microbial Enzymes and Bioconversions**. five ed., p.227–282, 1980. London: Academic Press.

ROSA, P. A. J. A J.; AZEVEDO, A. M. M.; SOMMERFELD, S.; BÄCKER, W.; AIRES-BARROS, M. R. R. Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: economical and environmental sustainability. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 559–67, 2013. Elsevier Inc.

SÁNCHEZ-FERRER, A.; BRU, R.; GARCIA-CARMONA, F.; SÁNCHEZ-FERRER, A. Partial Purification of a Thylakoid-Bound Enzyme Using Phase Partitioning. **Analytical biochemistry**, v. 184, p. 279–282, 1990.

SÁNCHEZ-FERRER, A.; PÉREZ-GILABERT, M.; NÚÑEZ, E.; BRU, R.; GARCÍA-CARMONA, F. Triton X-114 phase partitioning in plant protein purification. **Journal of Chromatography A**, v. 668, p. 75–83, 1994.

SAWADA, K.; TOKINO, S.; UEDA, M.; WANG, X. Y. Bioscouring of cotton with pectinase enzyme. **JSDC**, v. 114, n. November, p. 333–336, 1998.

SHELLER, H. V.; JENSEN, J. K.; SØRENSEN, S. O.; HARHOLT, J.; GESHI, N. Biosynthesis of pectin. **Physiologia Plantarum**, v. 129, n. 2, p. 283–295, 2006.

SHORE, J. **Cellulosics dyeing**. United Kingdom: Society of Dyers and Colourists, 1995.

SIEIRO, C.; GARCÍA-FRAGA, B.; LÓPEZ-SEIJAS, J.; SILVA, A. F. DA; VILLA, T. G. Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine Industry. In: Benjamin Valdez (Ed.); **Food Industrial Processes - Methods and Equipment**. 1st ed., p.201–218, 2012. InTech.

SIGMA-ALDRICH. **Triton x-114-Product information**. .

SILVA, E. G. DA; FÁTIMA BORGES, M. DE; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS yeast research**, v. 5, n. 9, p. 859–65, 2005.

SILVA, E. M. D. A.; CARVALHO, H. A. S.; MICHELI, F. Biologia de Sistemas de Pectinases do Fungo *Moniliophthora perniciosa*. **Diálogos & Ciência**, v. 11, n. 33, p. 27–30, 2013.

SIMÕES, A. A. J. G.; HIDALGO, C.; HIDALGO, A. The Economic Complexity Observatory: An Analytical Tool for Understanding the Dynamics of Economic Development. Workshops at the Twenty-Fifth AAAI Conference on Artificial Intelligence. **Anais...** p.39–42, 2011.

SINITSYNA, O. A; FEDOROVA, E. A; SEMENOVA, M. V; et al. Isolation and characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens*. **Biochemistry**, v. 72, n. 5, p. 565–71, 2007.

SIQUEIRA, F. G. DE; SIQUEIRA, E. G. DE; JARAMILLO, P. M. D.; et al. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 20–26, 2010.

SOARES, M. M. C. N.; SILVA, R. DA; CARMONA, E. C.; GOMES, E. Pectinolytic enzyme production by Bacillus species and their potential application on juice extraction. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 79–82, 2001.

SOUZA, W. R. DE. Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization. In: A. K. Chandel; S. S. da Silva (Eds.); **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization improve**. p.207–233, 2013. InTech.

SOWBHAGYA, H. B.; CHITRA, V. N. Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 50, n. 2, p. 146–61, 2010. Taylor & Francis.

TANFORD, C. **The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes**. Segunda ed. New York: Wiley, 1980.

TARI, C.; GÖGÜS, N.; TOKATLI, F. Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1108–1116, 2007.

TOGASHI, C. K.; FONSECA, J. B.; RIBEIRO, T.; et al. Composição em ácidos graxos dos tecidos de frangos de corte alimentados com subprodutos de maracujá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 2063–2068, 2007.

UENOJO, M.; PASTORE, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388–394, 2007.

VLUGT-BERGMANS, C. J. B. VAN DER; MEEUWSEN, P. J. A.; VORAGEN, A. G. J.; OUYEN, A. J. J. VAN. Endo-Xylogalacturonan Hydrolase, a Novel Pectinolytic Enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 36–41, 2000.

YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K. D. S. Pectin lyase: A review. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 1–10, 2009.

YANO, T.; ITO, M.; TOMITA, K.; KUMAGAI, H.; TOCHIKURA, T. Purification and Properties of Glutaminase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 66, n. 2, p. 137–143, 1988.

YAPO, B. M.; KOFFI, K. L. Yellow passion fruit rind-a potential source of low-methoxyl pectin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2738–44, 2006.

YOSHITAKE, S.; NUMATA, T.; KATSURAGI, T.; HOURS, R. A.; SAKAI, T. Purification and Characterization of a Pectin-Releasing Enzyme Produced by *Kluyveromyces wickerhamii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 370–375, 1994.

YU, J.; PROCTOR, R. H.; BROWN, D. W.; et al. Genomics of Economically Significant *Aspergillus* and *Fusarium* Species. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 4, p. 249–283, 2004.

ZILLY, A.; SANTOS BAZANELLA, G. C.; HELM, C. V.; et al. Solid-State Bioconversion of Passion Fruit Waste by White-Rot Fungi for Production of Oxidative and Hydrolytic Enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 5, p. 1573–1580, 2012.

CAPITULO 2

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE PECTINASES PRODUZIDAS PELO FUNGO *Aspergillus oryzae* CRESCIDO EM CASCA DE MARACUJÁ-AMARELO COMO FONTE DE CARBONO

Resumo

Uma pectinase extracelular foi parcialmente purificada a partir de amostras de extrato bruto do fungo mesófilo *A. oryzae* quando cultivado em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono. A análise bromatológica determinou que casca de maracujá é particularmente rica em hemicelulose, seguido por lignina e celulose. O perfil de indução mostrou que a atividade pectinolítica aumentou de forma constante atingindo um valor elevado no décimo dia de crescimento. A pectinase (PEC-P1) foi parcialmente purificada por ultrafiltração e cromatografias de filtração em gel (Sephacryl S-200) e de troca iônica (HiTrap Q FF). A eletroforese sob condições desnaturantes do extrato bruto, do concentrado e da PEC-P1 mostrou duas bandas de proteína de aproximadamente 43 e 45 kDa, coincidente com as bandas de atividade de pectinases detectadas através do zimograma. A PEC-P1 apresentou maior atividade em pH 4,5 e a 55°C, 70°C e 75°C. A atividade enzimática foi inibida por íons Ag^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ca^{2+} e Hg^{2+} , EDTA e compostos fenólicos, ácido tânico e vanilina. A enzima foi ativada pelo íon Cu^{2+} e por compostos fenólicos, ácido ferúlico, cinâmico e 4-hidroxibenzoico. O concentrado diminuiu a viscosidade do suco de goiaba em 4,15%.

Palavras-chaves: *A. oryzae*, pectinase, casca de maracujá-amarelo, meio submerso, viscosidade.

Abstract

An extracellular pectinase was isolated from samples of crude extract of *A. oryzae* mesophilic fungus when grown on yellow passion fruit peel as the carbon source. The bromatological determined that passion fruit peel was particularly rich in hemicellulose, followed by lignin and cellulose. The profile showed that induction of pectinolytic activity increased steadily reaching the highest value on the tenth day of growth. The pectinase (PEC-P1) was partially purified by ultrafiltration, gel filtration chromatography, gel filtration chromatography (Sephacryl S-200) and ion exchange (HiTrap Q FF). The gel under denaturing conditions of the crude extract, concentrate and PEC-P1 showed two protein bands of approximately 43 and 45 kDa, coincident with that staining for pectinase activity. PEC-P1 was more active at pH 4.5 and 55°C, 70°C and 75°C. The enzyme activity was inhibited by some ions (Ag^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+}), EDTA and phenolic compounds (tannic acid and vanillin). The enzyme was activated by Cu^{2+} ion and phenolic compounds (ferulic acid, cinnamic acid and 4-hydroxybenzoic). The viscosity of guava juice was decreased by 4.15% when incubated with the concentrate sample.

Keywords: *A. oryzae*, pectinase, yellow passion fruit peel, submerged medium, viscosity.

1. Introdução

A produção agrícola brasileira é uma das mais importantes do mundo, produzindo e exportando café, açúcar de cana, soja, mandioca, frutas, entre outros e produtos a bases destes gerando uma grande quantidade de resíduos (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003). Nos últimos anos houve um aumento na tentativa de tornar mais eficiente a utilização desses resíduos, cuja disposição no meio ambiente causa sérios problemas de poluição. Com o advento da inovação biotecnológica na área de enzimas e tecnologia das fermentações, novas perspectivas estão sendo criadas.

O maracujá pertence à família Passifloraceae, constituída por quase 200 espécies nativas no Brasil. É uma fruta típica da América Tropical e o Brasil é o principal produtor mundial, sendo a região nordeste o mais importante polo produtor do País. A casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*) representa mais da metade do peso total do fruto e seu descarte inapropriado gera problemas ambientais como mau cheiro ao redor das indústrias de suco e foco para a presença de animais (FERREIRA et al., 2010). Um dos objetivos da indústria de alimentos é encontrar formas de aproveitamento para os seus resíduos, transformando-os em benefícios financeiros e minimizando os impactos ambientais (RUGGIERO et al., 1996).

Uma das aplicações em potencial desses resíduos consiste na sua utilização como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de produtos de maior valor agregado, tais como enzimas, álcoois, ácidos orgânicos, aminoácidos, metabólitos secundários biologicamente ativos e compostos aromáticos (ALKORTA et al., 1998; UENOJO et al., 2007; JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013) agregando valor à cadeia produtiva, além de reduzir as emissões de carbono para a atmosfera e contribuir para a viabilidade econômica de tais processos, uma vez que estes produtos apresentam baixo valor econômico no final da cadeia produtiva.

As substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular que formam o maior componente da lamela média, uma fina camada de

material adesivo extracelular entre as paredes primárias de células de vegetais superiores (UENOJO et al., 2007). O esqueleto péctico é primariamente um homopolímero de ácido galacturônico ligado em $\alpha(1\rightarrow4)$, com grau variável de grupos carboxilas metil esterificados (CANTERI et al., 2012).

As enzimas encarregadas da hidrólise das substâncias pécticas são amplamente conhecidas como pectinases, e incluem poligalacturonases, pectina esterases, pectina liases e pectato liase, dependendo do modo de ação. Estas são produzidas por uma ampla variedade de micro-organismos tais como bactérias, leveduras, fungos e actinomicetos (ALKORTA et al., 1998).

As pectinases foram as primeiras enzimas a serem utilizadas industrialmente (RIBEIRO et al., 2010). O seu uso na produção de suco está relacionado com vários processos como clarificação, maceração, extração, estabilização da cor do suco durante o armazenamento e no aumento de rendimento. Uma variedade de pectinases com atividade enzimática em diferentes intervalos de pH e temperaturas permite ampliar o campo de ação destas enzimas (RIBEIRO et al., 2010).

2. Objetivo

Produzir, purificar parcialmente e caracterizar pectinases secretadas pelo fungo *A. oryzae* quando crescido em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono em fermentação submersa.

3. Material e métodos

3.1. Origem dos reagentes

Os reagentes pectina de frutas cítricas, xilana de aveia, carboximetil-celulose (CM-celulose), manana, celulose microcristalina (avicel) e o corante vermelho de rutênio foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, USA). As colunas

cromatográficas Sephacryl S-200 e HiTrap™ Q *Fast Flow* (HiTrap Q FF), o papel filtro (FP) (Whatman No. 1) e o kit de marcador de massa molecular *Low Molecular Weight* (LMW) foram adquiridos da GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, USA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2. Resíduos Agroindustriais

3.2.1. Origem dos resíduos

As frutas maduras de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis sims*), limão-taiti (*citrus latifolia*), laranja 'pêra' (*Citrus sinensis* L. *Osbeck*) e goiaba-vermelha (*Psidium guajava* L) foram adquiridas de um fornecedor local de Brasília, DF. O pó-de-filtro (resíduo do tratamento do algodão) foi adquirido da indústria Hantex - Resíduos Têxteis Ltda., Gaspar, SC.

3.2.2. Pré-tratamento

As frutas de maracujá-amarelo, limão-taiti e laranja 'pêra' foram lavadas em água corrente, descascadas e secas a 65°C por 48 horas em estufa. O pó-de-filtro foi previamente autoclavado a 121°C por 2 horas e, posteriormente, lavado em água corrente e seco a 65°C por 48 horas em estufa. Todos os substratos, após a secagem, foram triturados em moinho de bancada para obtenção de pequenas partículas homogêneas (Figura 14).

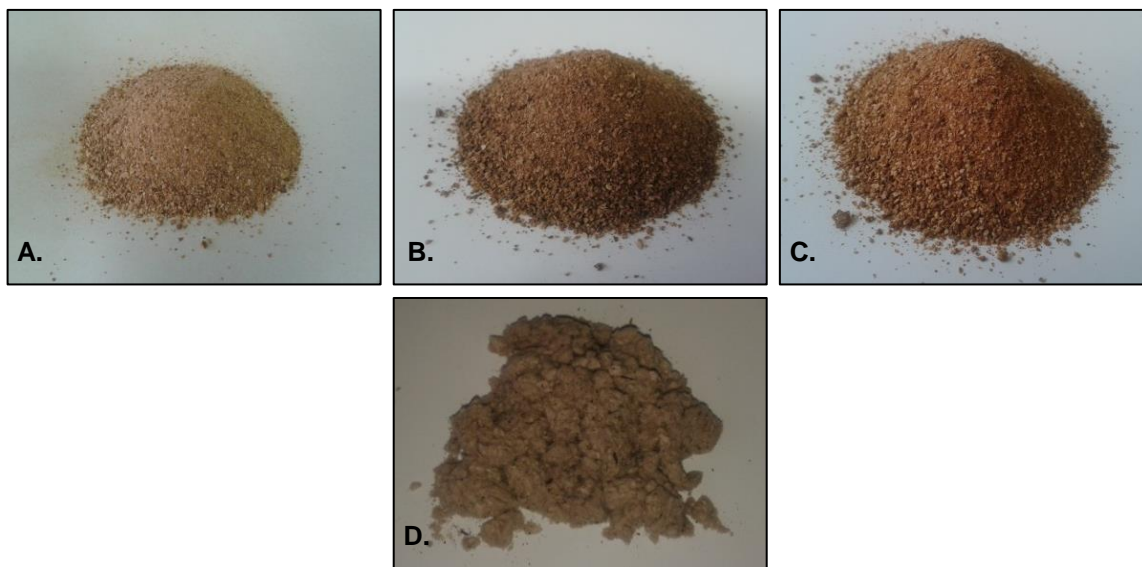


Figura 14. Resíduos agroindustriais pré-tratados: **A.** Casca de maracujá-amarelo; **B.** Casca de limão-taiti; **C.** Casca de laranja 'pêra'; **D.** Pó-de-filtro.

3.2.3. Análise Bromatológica

A análise bromatológica da casca de maracujá-amarelo foi feita pelo Professor Dr. Carlos Frederico de Souza Castro - laboratório de Química Tecnológica do Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde – GO, utilizando as metodologias descritas por Li e colaboradores (2004) e Lin e colaboradores (2010).

3.2.3.1. Análise dos extraíveis

Foram pesados 5 g do material lignocelulósico (m_0) e transferidos para um extrator Soxhlet. A extração ocorreu por 8 horas, usando-se cerca de 300 mL de hexano PA. Após a extração, o material foi seco a 35 - 40°C até atingir peso constante e pesado (m_1). A diferença de massa corresponde ao teor de extraíveis ($m_0 - m_1$). O percentual de extraíveis (%E) foi calculado por:

$$\%E = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100\%$$

3.2.3.2. Análise da Hemicelulose

Foi utilizado 1 g (m_1) do material lignocelulósico (livre de extraíveis). Este material foi acrescido de 10 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio (500 mM - 20 g/L). A mistura foi fervida por 3,5 horas, filtrada e lavada com água destilada. O resíduo sólido foi seco a 35 - 40°C e pesado até atingir peso constante (m_2). A diferença das massas corresponde à hemicelulose. O percentual de hemicelulose (%HC) foi calculado por:

$$\% HC = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \times 100\%$$

3.2.3.3. Análise de Lignina

Foi utilizado 1 g (m_3) do material lignocelulósico (livre de extraíveis) e este foi acrescido de 30 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico (72% - 72 mL de ácido sulfúrico concentrado com 28 mL de água destilada). A mistura ficou em repouso por 24 horas e depois foi diluída com 300 mL de água destilada e fervida por 1 hora. A mistura foi filtrada e o resíduo sólido foi lavado com água destilada. O resíduo sólido foi seco a 35 - 40°C e pesado (m_4). Esta massa corresponde ao teor de lignina. O percentual de lignina (%L) foi calculado por:

$$\%L = \frac{m_4 (1 - \%E)}{m_3} \times 100\%$$

3.2.3.4. Análise de Celulose

A celulose foi determinada pela diferença entre a massa original e os teores de extraíveis, hemicelulose e lignina. O percentual de celulose (%/C) pode ser determinado por:

$$\% C = 100 - \%E - \%HC - \%L$$

3.3. Isolamento, manutenção e identificação do fungo

O fungo filamentososo *A. oryzae* (BLU-37) foi isolado da compostagem natural de resíduos da indústria de rebeneficiamento de fibras de algodão (Hantex Ltda., região do Vale do Itajaí, Gaspar, SC) e, posteriormente, identificado fenotipicamente pelo professor Dr. Luís Roberto Batista do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (SIQUEIRA et al., 2010). A identificação genotípica foi feita no Laboratório de Microbiologia: Interação Planta-Praga do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília sob a supervisão do professor Dr. Robert Miller conforme metodologia no Anexo 1. O isolado encontra-se depositado na Micoteca do laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília dentro do âmbito da rede Sisbiota de fungos filamentosos com autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético número 010770/2013-5 sob supervisão do Professor Dr. Edivaldo Ximenes.

3.4. Conservação do fungo

O isolado foi mantido em meio sólido Batata-Dextrose-Ágar (BDA) contendo caldo de batata 2,0% (p/v), dextrose 1,0% (p/v) e ágar 2,0% (p/v), com repiques realizados periodicamente e preservado a -80°C em criotubos, contendo glicerol 50% (v/v).

3.5. Cultivo em meio líquido

O fungo *A. oryzae* foi submetido a cultivos submersos utilizando diferentes fontes de carbono, entre elas casca de limão-taiti (*Citrus latifolia*), casca de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis sims*), fibra de algodão (pó-de-filtro) e casca de laranja 'pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) em frasco do tipo Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de meio líquido com a seguinte composição (DUARTE et al.,

2012): 0,7% de KH_2PO_4 ; 0,2% de K_2HPO_4 ; 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,16% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,06% de extrato de levedura e 1% (p/v) da fonte de carbono lignocelulósica (casca de limão-taiti, de maracujá-amarelo, de laranja 'pêra' ou pó-de-filtro, separadamente), em pH 6,8. A inoculação foi feita por suspensão de esporos (10^6 ou 10^7 esporos/mL) obtidos de cultura pura em BDA. O cultivo foi realizado por seis dias a 28°C com agitação constante de 120 rpm. Os meios de cultura contendo a massa micelial foram filtrados à vácuo em funil de Büchner com papel de filtro (Whatman N° 1) e armazenados a 4°C , com adição de 0,1% de azida sódica. O filtrado, denominado extrato bruto (EB), foi usado como fonte de holocelulases.

3.6. Determinação da atividade enzimática das holocelulases

Os ensaios enzimáticos para a determinação de holocelulases (endoglicanase/CMCase, xilanase, pectinase e mananase) foram realizados pelo método de DNS, conforme descrito por Miller (1959) e adaptado por Vale (2012), tendo 5 μL de enzima e 10 μL de substrato 1% (Anexo 2). A incubação foi realizada a 50°C por 30 minutos (FILHO et al., 1993). Após este período, foram adicionados 30 μL de DNS e a mistura foi novamente incubada por 10 minutos a 97°C (MILLER, 1959), sendo, posteriormente, acrescentado 150 μL de água destilada. A quantidade de açúcares redutores foi quantificada pela leitura da absorbância a 540 nm (SpectraMax M2e, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, EUA).

Para o ensaio de FPase (celulase total), foi utilizado como substrato papel Whatman número 1, em forma de tiras de 0,5 x 3 cm, com, aproximadamente 25 mg de massa. As tiras de papel foram incubadas com 75 μL de solução de enzima por 1 hora, a 50°C . Para a determinação de avicelase (exoglicanase), foi utilizado 50 μL de solução 1% de celulose microcristalina (avicel) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5 e 50 μL de solução de enzima por 2 horas, sob agitação, a 50°C . Os ensaios de FPase e avicelase foram interrompidos e analisados como descrito acima.

As atividades enzimáticas foram expressas em UI/mL, sendo definida como a quantidade de açúcares redutores liberados na unidade de tempo por mililitro de enzima (μmol de açúcar redutor/min/mL).

Para determinar a quantidade de açúcar redutor liberado durante os ensaios enzimáticos foram construídas curvas de calibração com ácido D-galacturônico, D-xilose, D-glicose e D-manose. Estas foram realizadas com uma solução estoque de 2 mg/mL de cada monossacarídeo variando a concentração do açúcar redutor entre 0,2 – 1,2 mg/mL com água destilada, totalizando sempre o volume final de 15 μL . Do gráfico foi obtida a equação da reta que foi utilizada para quantificar o total de açúcar redutor após a leitura.

3.7. Proteína Total

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando o Kit *Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, EUA). Uma solução de BSA (albumina sérica bovina) (0,1 mg/mL) foi usada para construção da curva padrão, de acordo com instruções do fabricante.

3.8. Curva de produção enzimática

A produção de pectinases pelo fungo *A. oryzae* quando crescido em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono foi mensurada a cada 24h durante um período de 20 dias. O cultivo foi realizado em triplicata como descrito no item 3.5 do presente capítulo. Alíquotas de 1 mL foram retiradas diariamente e a atividade de pectinases e proteína total foram determinadas conforme item 3.6 e 3.7 do presente capítulo, respectivamente.

3.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os experimentos de microscopia eletrônica de varredura foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular do

Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob a supervisão da Professora Dr. Sônia Bão.

A colonização da casca do maracujá-amarelo pelo fungo *A. oryzae* após 10 dias de cultivo foi analisada mediante imagens obtidas através de MEV. A massa micelial, após filtração ao vácuo em funil de Büchner com papel de filtro comum, foi submersa por cinco horas na solução fixadora Karnovsky (0,1 M; pH 7,2) (KARNOVSKY, 1965) (Anexo 3) e, posteriormente, lavada três vezes com o tampão cacodilato de sódio (0,05 M pH 7,4). Posteriormente, o material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio (1%) durante 1 hora, lavado com água destilada e desidratado gradualmente utilizando acetona em diferentes concentrações (30%, 50%, 70%, 90% e 100% v/v) por 15 minutos cada uma. Posteriormente, o material foi submetido ao procedimento de secagem ao ponto crítico com CO₂ no equipamento Balzers modelo CPD 030 (Balzers Union AG, Liechtenstein, Alemanha), fixado no porta espécime (*stubs*) com fita de carbono dupla fase e revestido em câmara de vácuo com vapores de ouro no equipamento Balzers modelo SCD 050 (Balzers Union AG, Liechtenstein, Alemanha) e submetido a análise no microscópio eletrônico de varredura marca JEOL, modelo JSM-700 1F (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) a 15.0 kV.

3.10. Ultrafiltração

O extrato bruto, obtido após cultivo do fungo por 10 dias, foi concentrado dez vezes pelo processo de ultrafiltração utilizando uma membrana com retenção de 10 kDa (suporte em Polyethersulfone) e 76 mm de diâmetro (Amicon Millipore Co., Bedford, MA, USA) pelo sistema Amicon Filtration System-Stirred Cells com pressão de 75 psi a 4°C. O material resultante da cromatografia de exclusão molecular foi concentrado três vezes com membrana de retenção de 30 kDa.

3.11. Purificação parcial em cromatografia de exclusão molecular

A purificação parcial foi realizada a 24°C. Alíquota da amostra concentrada pelo processo de ultrafiltração foi fracionada por cromatografia de filtração em gel em coluna Sephacryl S-200 (3,0 cm x 71,0 cm) equilibrada com tampão fosfato de

sódio (50 mM pH 7) e NaCl (0,15 M). Frações de 3 mL foram eluídas com fluxo de 20 mL/h. O perfil de proteína total foi determinado pela leitura das frações no comprimento de onda de 280 nm no SpectraMax M2e (Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, EUA). A atividade de pectinase foi determinada conforme descrito no item 3.6 do presente capítulo. Frações correspondentes à pectinase foram coletadas e concentradas pelo sistema de ultrafiltração conforme descrito no item 3.10 com uma membrana de retenção de 30 kDa. O concentrado foi armazenado a 4°C para uma posterior cromatografia de troca iônica.

3.12. Cromatografia de troca iônica

A cromatografia de troca iônica foi realizada a 19°C. Um volume de 5 mL da amostra previamente concentrada foi aplicado em uma coluna de 5 mL de troca iônica HiTrap™ Q *Fast Flow* (HiTrap Q FF - GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio (10 mM pH 7,0) no Sistema *Äkta purifier* (GE Healthcare). A amostra de 5 mL foi eluída com o mesmo tampão citado anteriormente sob um fluxo fixo de 60 mL/h e após 15 mL de eluição foi aplicado o gradiente linear de NaCl (0 – 1,0 M). Frações de 1 mL foram coletadas e analisadas quanto à presença de proteínas no comprimento de onda a 280 nm. O grau de pureza das amostras foi analisado por eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).

3.13. Caracterização enzimática

Para determinar o efeito do pH na atividade de pectinase, as amostras de extrato bruto, concentrado e a enzima parcialmente purificada (PEC-P1) foram avaliadas na presença de tampões de diferentes valores de pH no intervalo de 3,0 - 9,0. Os tampões avaliados foram acetato de sódio 50 mM (pH 3,0 – 6,0), fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0 - 7,5) e tris-HCl (pH 7,5 - 9,0). Todos os tampões, independentemente do pH, foram ajustados para a mesma força iônica com NaCl. A determinação do efeito do pH na atividade de pectinase foi feita em microensaio através do método do ácido 3,5-dinitro-salicílico (DNS) conforme previamente descrito no item 3.6.

Para avaliar o efeito da temperatura na atividade de pectinase foram realizados ensaios enzimáticos como descrito no item 3.6 do presente capítulo alterando a temperatura de incubação de 40°C até 70°C. Todos os ensaios foram feitos em quintuplicata e os desvios padrões foram menores que 10% da média.

3.14. Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

O grau de pureza das amostras enzimáticas (extrato bruto, concentrado e PEC-P1) foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, conforme descrito por Laemmli (1970). Eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida a 12% (v/v) foi realizada utilizando sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) para mini-gel (60 x 80 x 0,75 mm) contendo SDS 0,1% (p/v). O gel concentrador foi preparado a 5,0% (v/v) contendo SDS 0,1% (p/v). As amostras foram previamente submetidas à precipitação por solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) em água e incubadas por 1 h a 4°C. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 18.600 x g por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas por duas vezes com 1,0 mL/tubo de acetona P.A. refrigerada e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos, para secagem. Após este período, as amostras foram ressuspensas em 20 µL de água milli-Q, e, a este volume, foram adicionados 10 µL de tampão de amostra [tris-HCl 312 mM, pH 7; SDS 2,0% (p/v); azul de bromo fenol 0,05% (p/v); glicerol 20% (v/v) e β-mercaptoetanol 5,0% (v/v)]. A mistura foi aquecida por três minutos a 98°C. A eletroforese foi realizada em tampão [tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM e SDS 0,075% (p/v), pH 8,3 após diluição], à temperatura ambiente, submetida a 25 mA por 40 minutos. O marcador de massa molecular *Low Molecular Weight* (LMW) (GE Healthcare) contendo as proteínas fosforilase b (97,0 kDa), soroalbumina bovina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa) foi utilizado como referência de migração para determinação das massas moleculares aparentes. Uma concentração de 10 µg/mL de proteína por gel foi definida para cada amostra.

3.15. Coloração de proteínas por nitrato de prata

Após a separação das amostras em SDS-PAGE, as bandas protéicas foram reveladas utilizando o método descrito por Blum e colaboradores (1987). O gel foi incubado sob agitação em solução fixadora [metanol 40% (v/v), ácido acético 7% (v/v)] por 1 hora, a qual foi reservada para a etapa final de coloração. Em seguida, o gel foi lavado por três vezes em solução etanol a 50% (v/v) durante 20 minutos cada, sob agitação. Após as lavagens, o gel foi incubado por 1 minuto em solução de tiosulfato de sódio 0,02% (p/v), lavado três vezes com água destilada durante 10 segundos cada e incubado em solução de coloração [nitrato de prata 0,2% (p/v), formaldeído 0,03% (v/v) para 50 mL de água destilada] por 15 minutos sob agitação. Novamente, o gel foi lavado três vezes com água destilada, durante 10 segundos cada e submetido à solução reveladora [carbonato de sódio 6,0% (p/v), tiosulfato de sódio 0,004% (v/v), formaldeído 0,02% (v/v) para 50 mL de água destilada]. A reação foi interrompida com solução fixadora após o surgimento das bandas. O gel foi armazenado em solução ácido acético 0,5% (v/v), para ser foto-documentado, posteriormente, em scanner comercial Hewlett Packard Scanjet modelo G2410 (Hewlett-Packard Co.; Palo Alto CA, USA).

3.16. Zimograma

As amostras enzimáticas de extrato bruto, concentrado e PEC-P1 foram submetidas à técnica de zimograma através da eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes a 12% (v/v), como descrito no item 3.14 do presente capítulo, co-polimerizado com solução pectina de frutas cítricas 0,1% (v/v) como descrito por Cruickshank e Wade (1980). O preparo das amostras também foi realizado como descrito no item 3.14 do presente capítulo. O marcador de massas moleculares utilizado como referência de migração para determinação das massas moleculares aparentes foi o *Low Molecular Weight* (LMW), conforme já mencionado item 3.14. Após a eletroforese, o gel foi incubado duas vezes em solução Triton[®] X-100 2,5% (v/v) por 30 minutos cada a 28°C sob agitação. Em seguida, o gel foi incubado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0 por 90 minutos a 50°C sob agitação. A reação foi interrompida pela incubação do gel a 4°C por uma hora.

Posteriormente, o gel foi lavado com água destilada e imerso em solução vermelho de rutênio 0,02% (p/v) por 30 minutos a 50°C sob agitação. Por fim, o gel foi descorado com água destilada até o aparecimento das bandas translúcidas. O gel foi foto-documentadas em scanner comercial. Uma concentração de 10 ug/mL de proteína por gel foi definida para cada amostra.

3.17. Termoestabilidade

O estudo da termoestabilidade das atividades pectinolíticas das amostras do extrato bruto e concentrado foi determinada a 50°C através da incubação por um período máximo de 32 horas. Para PEC-P1, a termoestabilidade foi determinada a 55°C e 70°C e 60 minutos de incubação. A atividade enzimática residual foi determinada pelo método DNS (MILLER, 1959) como descrito no item 3.6 do presente capítulo.

3.18. Efeito de íons metálicos

Para avaliar o efeito dos íons metálicos e EDTA na atividade enzimática, a PEC-P1 foi incubada com Ag^+ , K^+ , Na^+ , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+}) e EDTA, separadamente, em concentrações finais de 1 mM e 10 mM por 20 minutos a 28°C, e a atividade residual de pectinase foi quantificada conforme descrito no item 3.6 do presente capítulo. Os desvios-padrão foram calculados como percentuais da média para o ensaio correspondente. A atividade foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade correspondeu à atividade realizada na ausência de íons metálicos.

3.19. Efeito de compostos fenólicos

O efeito de compostos fenólicos na atividade da PEC-P1 foi avaliado pela pré-incubação a 28°C da amostra enzimática com vanilina, ácido ferúlico, p-coumárico, cinâmico, 4-hidroxibenzóico e tânico, na concentração de 1 mg/mL, dissolvidos em água (vanilina e ácido ferúlico) ou etanol (ácidos cinâmico, 4-hidroxi-benzóico, p-coumárico e tânico). O efeito de inibição foi quantificado após a incubação da enzima

com os compostos fenólicos. A atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 3.6 do presente capítulo. Os controles foram feitos com a pré-incubação das enzimas com água ou etanol e submetidos às mesmas condições de ensaio. Os desvios-padrão foram calculados como percentuais da média para o ensaio correspondente. A atividade foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade correspondeu à atividade realizada na ausência de compostos fenólicos.

3.20. Viscosidade

Para avaliar uma possível aplicação industrial do concentrado e da PEC-P1, foi determinado o efeito da ação enzimática na viscosidade da polpa de goiaba-vermelha (*Psidium guajava* L) conforme protocolo modificado de Surajbhan e colaboradores (2012). A viscosidade foi determinada utilizando um viscosímetro rotacional digital da marca Brookfield, modelo DV-E (Brookfield Engineering, Stoughton, MA, USA) equipado com cilindros de diâmetros diferentes (*spindles*), em que o cilindro adequado é utilizado conforme a viscosidade do fluido. Para o suco de goiaba foi utilizado um cilindro número 3 (referencia RV-3) a 60 rpm.

A polpa foi produzida no laboratório utilizando um liquidificador caseiro simples em uma proporção de 1:1 (p/v) com água destilada e, posteriormente, peneirada e incubada em frascos do tipo erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de polpa a 40°C, 180 rpm por 60 minutos. As concentrações do concentrado e da PEC-P1 foram 0,2% e 0,5% (v/v). Após o período de incubação, procedeu-se à inativação enzimática, aquecendo o material a 97°C por cinco minutos. O resfriamento foi feito por imersão em água até atingir 28°C para, posteriormente, realizar as leituras da viscosidade. Os experimentos foram feitos em triplicata, utilizando-se para cada repetição, uma nova amostra. O controle foi feito com a substituição da enzima pelo tampão fosfato de sódio, 10 mM pH 7,0 nas mesmas condições de ensaio.

3.21. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à ANOVA One way e post-hoc teste Tukey de comparação pareada, com nível de significância de 0,05%. Todas as análises

estatísticas foram feitas no software Past (PAleontological STatistics) Versão 2.15 (HAMMER et al., 2001).

4. Resultados e discussão

4.1. Produção de pectinases

O cultivo do fungo *A. oryzae* em meio líquido suplementado com as cascas de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis sims*), limão-taiti (*citrus latifolia*) e laranja 'pêra' (*Citrus sinensis* L. Osbeck), além do pó-de-filtro (resíduo do tratamento do algodão), separadamente, como fonte de carbono por 6 dias mostrou que a casca de maracujá-amarelo foi a fonte de carbono que proporcionou a maior atividade pectinolítica (242,80 UI/mL) e específica (1,279 UI/mg), quando comparado com os outros substratos sendo este escolhido para dar continuidade ao trabalho (Figura 15).

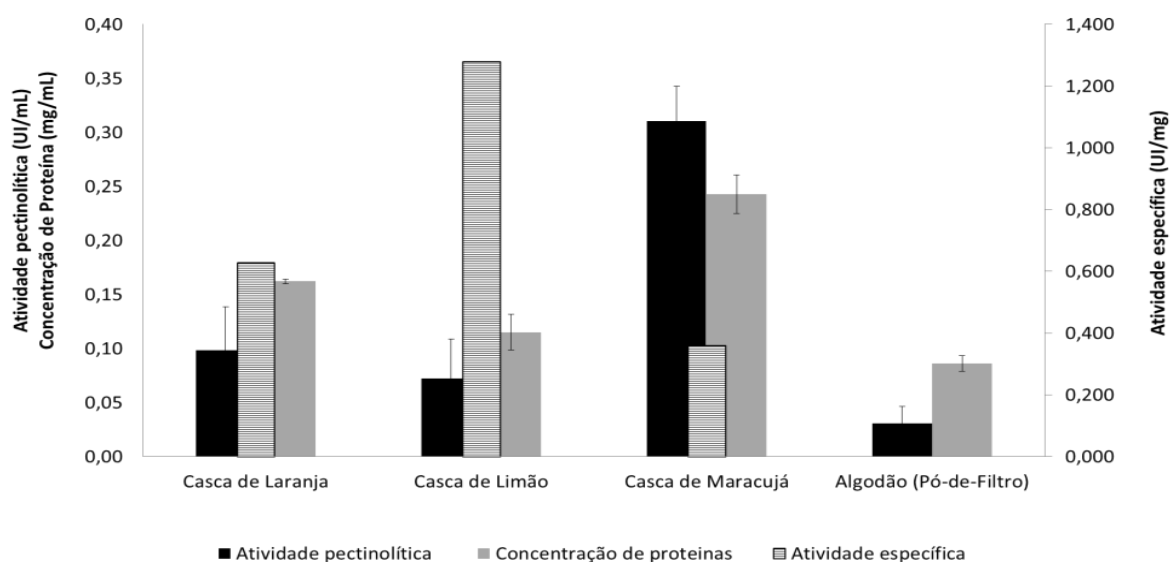


Figura 15. Determinação da atividade pectinolítica e dosagem de proteínas totais (BRADFORD, 1976) do cultivo em meio líquido do fungo *A. oryzae* crescido em quatro fontes de carbono (maracujá-amarelo, limão-taiti, laranja 'pêra' e pó-de-filtro – 1%) por seis dias a 28°C com agitação constante (120 rpm).

Maller (2008) avaliou a produção de enzimas pectinolíticas do fungo *A. niveus* quando cultivado em diferentes fontes de carbono destacando a casca de maracujá como um dos melhores substratos para a produção destas enzimas. Este trabalho se apresenta como o primeiro registro da produção de pectinases pelo fungo *A. oryzae* crescido em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono em meio líquido.

A análise bromatológica determinou que a casca de maracujá-amarelo apresenta boa porcentagem de hemicelulose (38,7%), seguido de lignina (30,2%) e de celulose (25,9%) (Tabela 5). Um baixo nível de extraíveis (5,2%), compostos orgânicos de baixo peso molecular, tais como ácidos graxos, ceras e terpenos, também foi detectado. Portanto, esses valores justificam o estudo da utilização das cascas de maracujá-amarelo para a indução de pectinases, celulasas e xilanases por fungos filamentosos.

Tabela 5. Análise bromatológica da casca de maracujá-amarelo.

Material/Análise	Extraíveis (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Celulose (%)
Casca de Maracujá - Sem Pré-tratamento	5,2 ± 0,3	38,7 ± 3,5	30,2 ± 1,5	25,9 ± 1,7

Após a seleção da fonte de carbono, foi realizado um perfil cinético de indução utilizando a casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono por 20 dias, avaliando diariamente a produção de pectinases e de proteínas totais. O perfil de indução de pectinases demonstrou que o décimo dia foi o tempo ideal para a indução de pectinases nesta fonte de carbono (Figura 16). O fato das pectinases serem produzidas tardiamente deve-se que a produção e liberação das enzimas ao meio esta sujeita a mecanismos de regulação e síntese, visto que o processo de indução dessas enzimas está sujeito a modificações na estrutura do substrato que ocorrem durante o crescimento do fungo (FERRAZ, 2010; GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010).

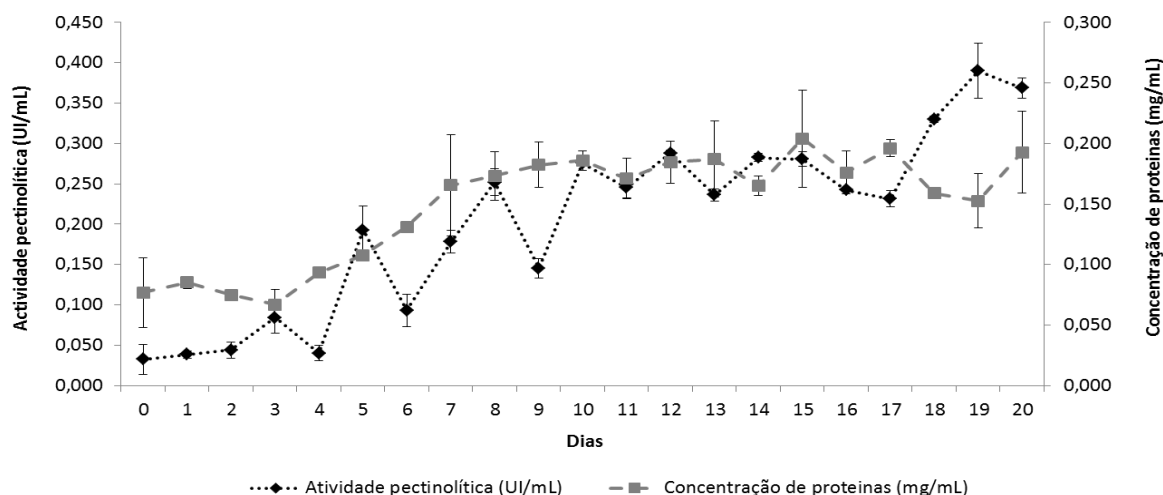


Figura 16. Perfil cinético de produção de pectinases pelo fungo *A. oryzae* crescido em casca de maracujá como fonte de carbono por 20 dias.

Imagens obtidas por MEV (Figura 17) mostram a colonização do substrato pelas hifas, apresentando um crescimento heterogêneo. A biodegradação dos materiais lignocelulósicos, como a casca de maracujá, por fungos é atribuída à ação de uma série de enzimas tais como pectinase e compostos extracelulares de baixa massa molecular tais como álcool veratrílico, lignina-peroxidases, ácido oxálico e lacases (ARANTES; MILAGRES, 2009; AGUIAR; FERRAZ, 2011). Do ponto de vista microscópico, observa-se que a ação dos fungos lignocelulíticos ocorre por meio da penetração das hifas no lúmen das células vegetais. As hifas, aí instaladas produzem uma grande diversidade de metabólitos extracelulares que, então, atuam degradando a parede celular vegetal (FERRAZ, 2010). O cultivo em substratos lignocelulósicos possibilita fornecer elementos à nutrição fúngica, semelhante ao que ocorre em habitats naturais.

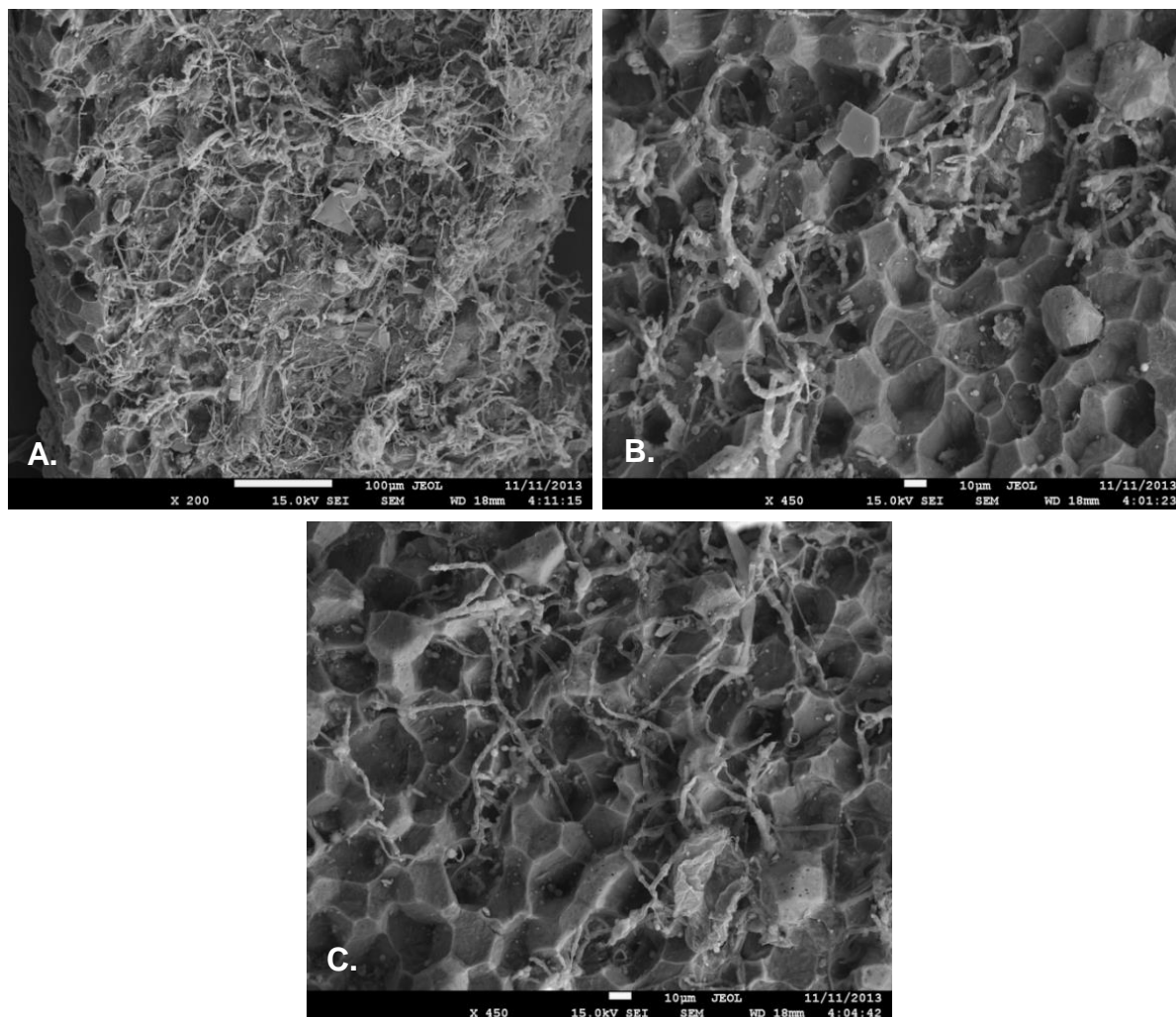


Figura 17: Micrografias por MEV da casca de maracujá-amarelo colonizada pelo fungo *A. oryzae* após 10 dias de cultivo (**A.** Aumento 200x; **B** e **C** Aumento 450x).

4.2. Caracterização do extrato bruto

A Tabela 6 apresenta os dados das atividades de holocelulases detectadas no extrato bruto proveniente do cultivo do fungo *A. oryzae* em casca de maracujá. Estes dados são semelhantes aos encontrados na literatura. Duarte e colaboradores (2012), após o cultivo do *A. oryzae* em resíduos do beneficiamento do algodão, detectaram atividades de xilanase e mananase inferiores às detectadas neste trabalho. Já os resultados da atividade pectinolítica, CMCase, FPase e Avicelase foram semelhantes. Siqueira e colaboradores (2010) após o cultivo do fungo *A. oryzae* no mesmo substrato utilizado por Duarte e colaboradores (2012) detectou atividade xilanolítica superior à detectada nos dois trabalhos. A atividade

pectinolítica e avicelase foram semelhantes e mananase, CMCCase e FPase foram inferiores. Quando cultivado o mesmo isolado em engaço de bananeira, as atividades xilanolítica e pectinolítica foram superiores. Dados da atividade de mananase, CMCCase, FPase e avicelase foram inferiores.

Tabela 6. Holocelulases presentes no extrato bruto de *A. oryzae* crescido em casca de maracujá-amarelo por 10 dias.

	Atividade enzimática (UI/mL)	Atividade específica (UI/mg)
Extrato Bruto		
Pectinase	0,224 ± 0,05	1,311
Xilanase	0,710 ± 0,01	3,817
Mananase	0,423 ± 0,02	2,274
CMCase	0,188 ± 0,03	1,010
FPase	0,157 ± 0,08	0,844
Avicelase	0,030 ± 0,00	0,161

Os resíduos agroindustriais representam uma importante fonte alternativa para o crescimento microbiano e produção de enzimas. A hidrólise enzimática da holocelulose presente nesses resíduos requer um arsenal de enzimas, incluindo celulasas, hemicelulasas e pectinases (SIQUEIRA et al., 2010).

O Brasil é o principal produtor mundial de maracujá e sua utilização industrial ou doméstica, gera, inevitavelmente, grandes quantidades de resíduos. A casca constitui cerca de metade da massa do fruto, de 50 a 55 g por 100 g. Este descarte gera um grande impacto ambiental e a procura por soluções torna-se um alvo importante para a biotecnologia (SEIXAS et al., 2014).

Os fungos do gênero *Aspergillus* têm várias características que os tornam os organismos ideais para aplicações industriais, tais como boa capacidade de fermentação e altos níveis de secreção de proteínas em particular uma ampla gama de enzimas para a degradação dos polissacarídeos da parede celular da planta as quais são de grande importância para a indústria alimentar (VRIES; VISSER, 2001).

O efeito da temperatura e do pH sobre pectinases presentes no extrato bruto está demonstrado nas Figuras 18A e 18B, respectivamente. A pectinase apresentou maior atividade no intervalo de pH 6,0 - 7,5 (tampão fosfato de sódio 50 mM), sendo mais ativa em pH 7,0 e 40°C. A menor atividade de pectinase foi verificada no intervalo de pH 7,5 - 9,0. Nesse caso em tampão Tris HCl 50 mM, resultado semelhante ao pH final do meio de cultivo, o qual não apresentou variação ao decimo dia de cultivo. O pH final do meio de cultura depende da espécie do fungo e do tipo de cultura (ISMAL, 1996).

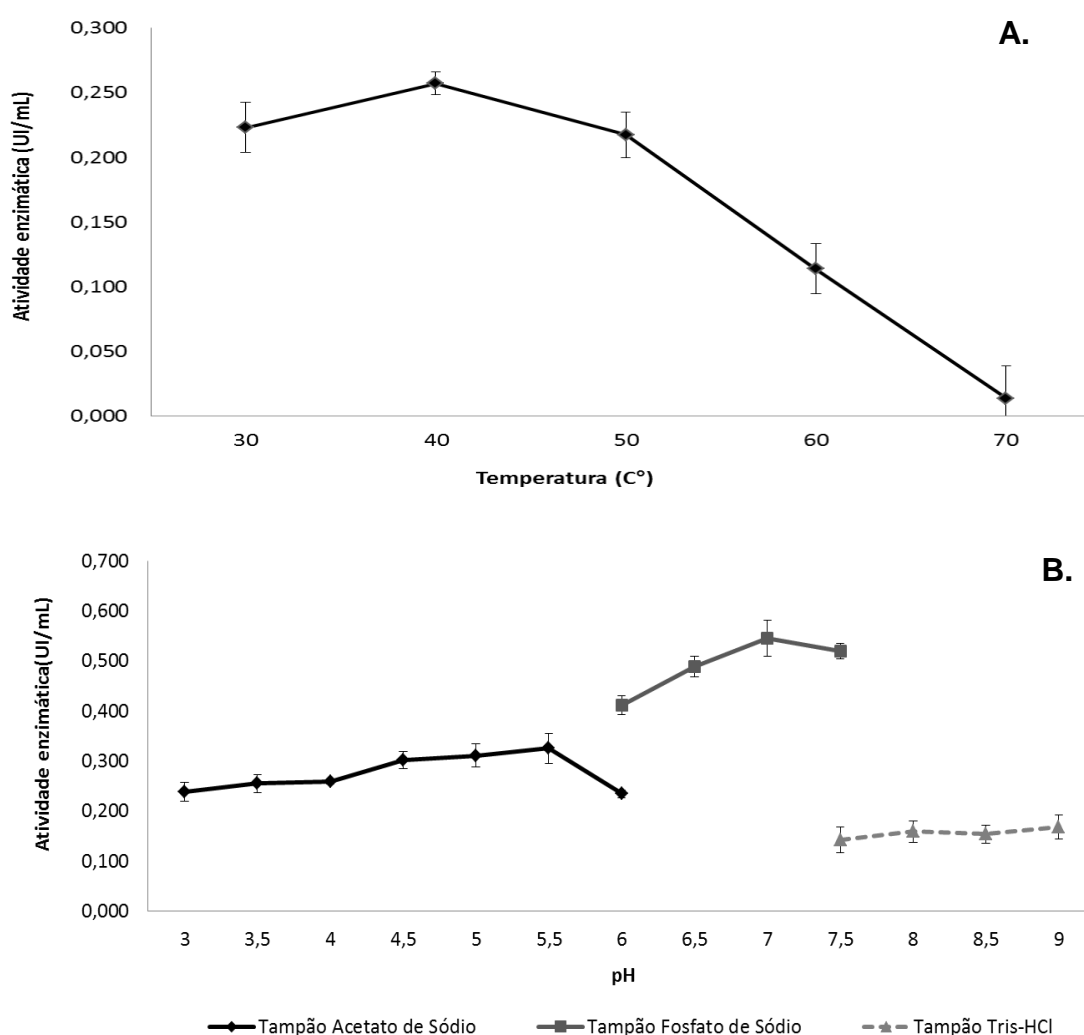


Figura 18. Efeito da temperatura (A) e do pH (B) na atividade pectinolítica do extrato bruto.

4.3. Ultrafiltração

O sistema pectinolítico de *A. oryzae* foi fracionado por ultrafiltração usando membrana de corte de 10 kDa. A presença de atividade pectinolítica no ultrafiltrado se deve, provavelmente, à habilidade de algumas poligalacturonases de mudarem sua conformação e permitir sua passagem pela membrana de ultrafiltração (LEI et al., 2007). O perfil de holocelulases de cada uma das frações é apresentada na Tabela 7. A atividade de pectinase teve um aumento de 315,17% no concentrado.

Tabela 7. Perfil enzimático do extrato bruto e das frações, ultrafiltrado e concentrado, usando membrana de corte de 10 kDa.

Fração	Atividade pectinolítica (UI/mL)	Atividade específica (UI/mg)
Extrato Bruto		
Pectinase	0,248 ± 0,03	0,568
Xilanase	0,710 ± 0,01	1,628
Mananase	0,433 ± 0,02	0,993
CMCase	0,298 ± 0,01	0,683
FPase	0,462 ± 0,07	1,059
Avicelase	0,062 ± 0,03	0,142
Concentrado		
Pectinase	0,930 ± 0,03	0,322
Xilanase	0,543 ± 0,02	0,189
Mananase	0,442 ± 0,02	0,154
CMCase	0,922 ± 0,02	0,324
FPase	0,539 ± 0,05	0,188
Avicelase	0,069 ± 0,03	0,024
Ultrafiltrado		
Pectinase	0,106 ± 0,01	0,592
Xilanase	0,181 ± 0,02	0,937
Mananase	0,117 ± 0,02	0,606
CMCase	0,111 ± 0,02	0,575
FPase	0,005 ± 0,01	0,026
Avicelase	0,036 ± 0,05	0,186

A escolha da fração concentrada se deu em função da alta atividade específica quando comparados com as outras enzimas presentes tais como xilanases, mananases, CMCases e avicelases. O efeito da temperatura e do pH sobre pectinases presentes no concentrado esta demonstrado, respectivamente, nas Figuras 19A e 19B. A atividade pectinolítica no concentrado foi mais significativa a 50°C e no pH 7,0 (tampão fosfato de sódio – 50 mM). As pectinases alcalinas estão entre as enzimas industriais mais importantes e de grande importância na área biotecnológica com várias aplicações no processamento têxtil, no tratamento de águas residuais pécnicas, na fabricação de papel, fermentações café e chá, na extração de óleo e na purificação de vírus de plantas (KASHYAP et al., 2001; HOONDAL et al., 2002). A produção de pectinases por fungos filamentosos torna se mais barata quando cultivados em resíduos agroindustriais, tais como a casca de maracujá, e ao mesmo tempo contribui se na eliminação dos resíduos gerados na indústria, os quais são um problema ambiental.

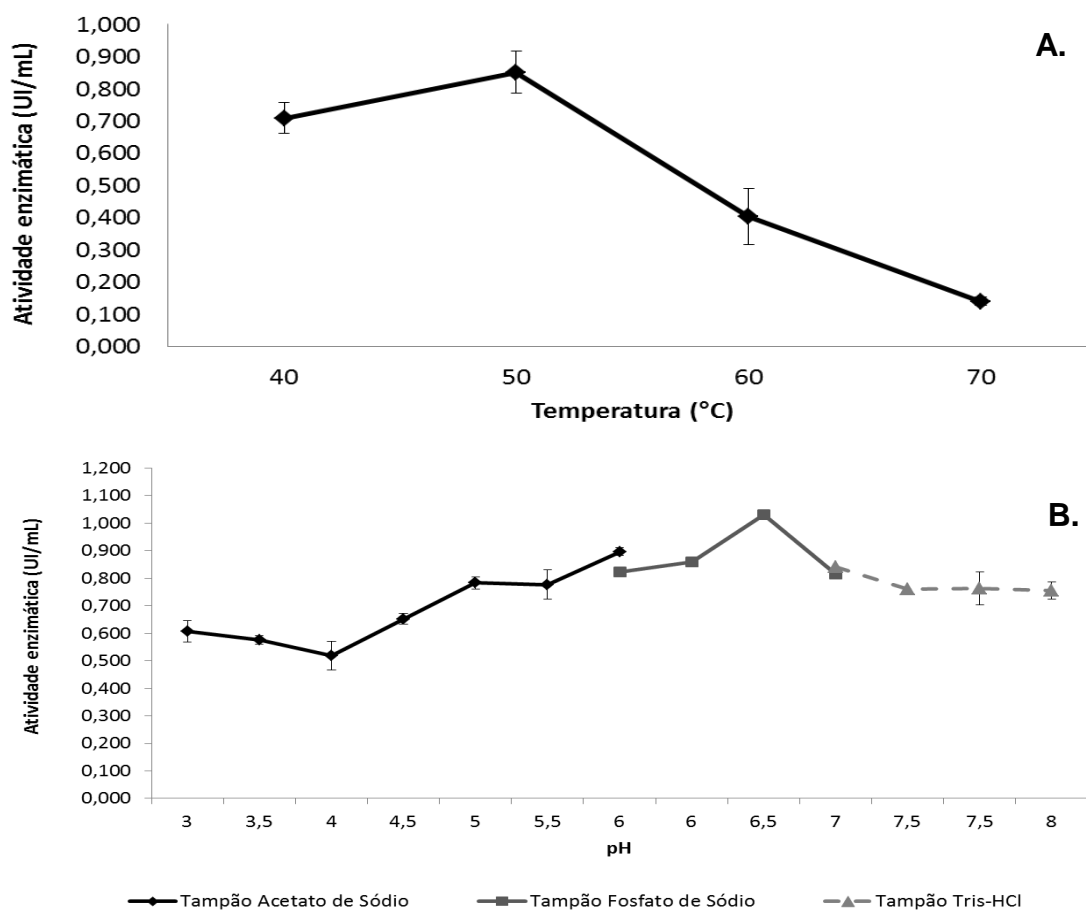


Figura 19. Efeito da temperatura (A) e do pH (B) na atividade pectinolítica do concentrado.

As amostras de extrato bruto e concentrado foram submetidas a ensaios de termoestabilidade (Figura 20) nos quais foi dosada a atividade residual de pectinase após um período de incubação a 50°C. Nesta temperatura, a atividade enzimática do extrato bruto foi reduzida em 93,66% após 8 horas de incubação. O concentrado teve uma diminuição de 47,18% e 83,17% da atividade enzimática após 8 e 24 horas de incubação, respectivamente.

Guo e colaboradores (2002) purificaram e caracterizaram parcialmente uma endo-poligalacturonase produzida pelo fungo *A. niger* a qual era estável em temperaturas abaixo de 35°C, mas era rapidamente inativada quando incubada a 40° e 50°C com perdas de 45% e 74% da atividade enzimática, respectivamente após 30 minutos de incubação e foi quase inativada a 60°C durante 5 minutos. Uma pectina metilesterase produzida pelo fungo *Fusarium asiaticum* apresentou atividade enzimática constante quando incubada a 25°C e 95°C durante 5 e 10 minutos (GLINKA; LIAO, 2011).

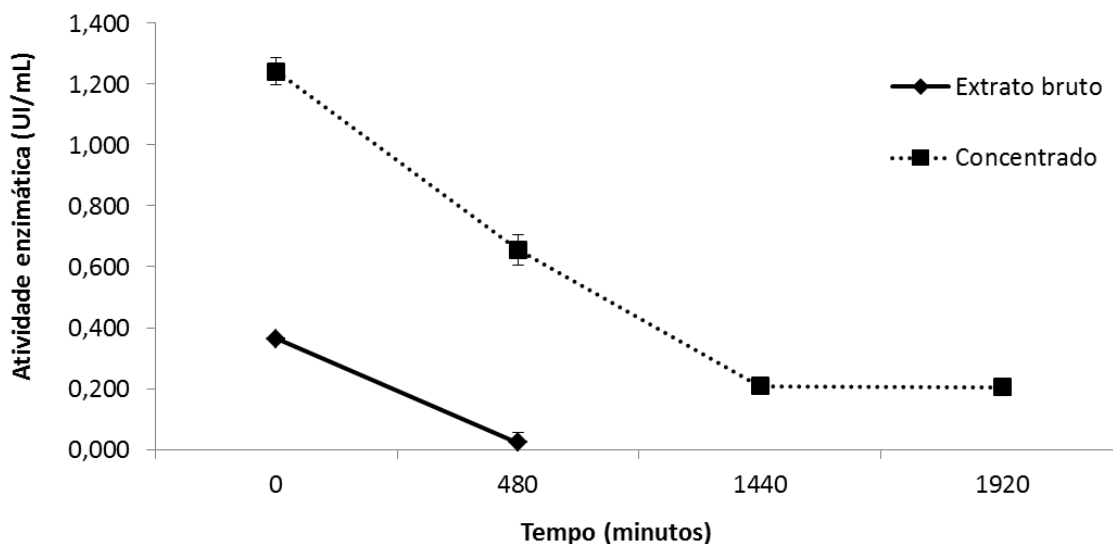


Figura 20. Termoestabilidade da pectinase do extrato bruto e concentrado a 50°C.

As estabilidades térmica em determinadas temperaturas e pH são considerados os parâmetros mais importantes a serem avaliados para a aplicação industrial de pectinases. Um melhor conhecimento das propriedades das pectinases

microbianas é importante na comercialização da produção industrial e na aplicação destas enzimas em vários processos industriais (GUMMADI; PANDA, 2003).

4.4. Cromatografia de filtração em gel (Sephacryl S-200)

O perfil cromatográfico do concentrado em resina de Sephacryl S-200 mostrou somente um pico de atividade de pectinase (Figura 21).

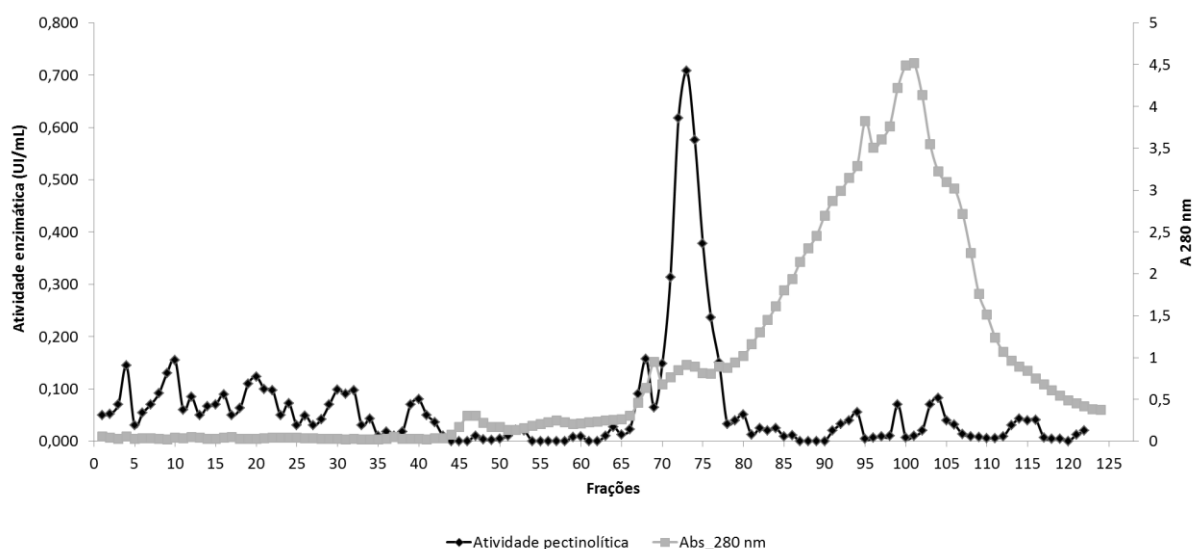


Figura 21. Perfil cromatográfico do concentrado em Sephacryl S-200

Na cromatografia de filtração em gel, a atividade enzimática foi eluída a partir da fração 71, com uma atividade de 0,314 UI/mL, que corresponde a 213 mL de corrida até a fração 76, com uma atividade de 0,236 UI/mL que corresponde a 228 mL de corrida. Todas as frações foram reunidas e concentradas por ultrafiltração com membrana de retenção de 30 kDa e armazenadas a 4°C para a posterior cromatografia de troca iônica. A atividade pectinolítica da fração concentrada (CONC2) após ultrafiltração foi de 0,217 UI/mL com uma concentração de proteína de 0,509 mg/mL. No ultrafiltrado não se detectou atividade pectinolítica.

O aumento da absorbância entre as frações 83 e 117 pode ser devido à presença de flavonoides da casca do maracujá (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005) que

apresentam bandas de absorção entre 240 nm e 285 nm (MERKEN; BEECHER, 2000).

4.5. Cromatografia de troca iônica (HiTrap Q FF)

O CONC2 foi parcialmente purificado em resina de troca aniônica do tipo HiTrap Q FF no sistema *Äkta purifier* (Figura 22).

Na cromatografia de troca aniônica, a amostra CONC2 foi eluída formando dois picos definidos. O primeiro começou na fração 8, com uma atividade enzimática de 0,111 UI/mL, eluído com 17,54 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM e 0,75% de NaCl 1M, e terminou na fração 9, com uma atividade enzimática de 0,114 UI/mL, com 22,18 mL e 10,02% de NaCl 1M. O segundo pico começou na fração 33, com uma atividade de 0,114 UI/mL, eluído com 45,64 mL de corrida e 56,71% de NaCl 1M, atingindo o pico máximo com uma atividade de 0,155 UI/mL na fração 35 com 44,64 mL de tampão e 60,71% de NaCl 1M. Para efeito didático, o primeiro pico foi chamado de PEC-P0 e o segundo pico PEC-P1 (Figura 22).

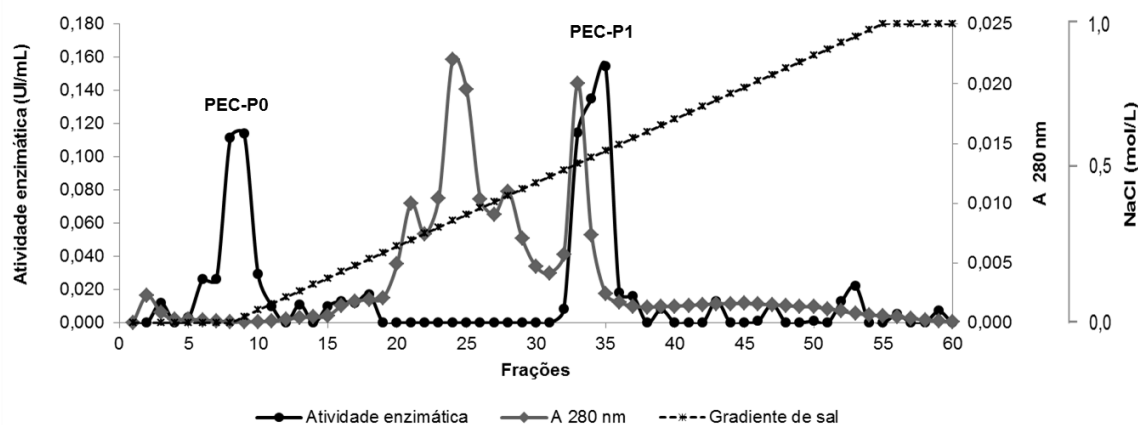


Figura 22. Perfil cromatográfico do concentrado (CONC2) em resina de troca iônica do tipo HiTrap Q FF em pH 7,0 com um fluxo fixo de 60 mL/h.

Pelo perfil cromatográfico, pode-se visualizar que a amostra inicial, CONC2, apresentou duas pectinases com diferentes forças de interação com a resina, as

quais são determinadas pelo número e pela localização das cargas na molécula e do grupo funcional (KHAN, 2012). Uma delas (PEC-P0), com fraca ligação à resina, com uma baixa concentração de NaCl para neutralizar a sua interação com a resina e a PEC-P1, a qual teve uma ligação mais forte com a resina, sendo necessário uma concentração maior de NaCl.

A Figura 23 ilustra de forma simplificada as etapas da purificação parcial de pectinase (PEC-P1) do fungo *A. oryzae* crescido em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono. Dados na literatura apresentam diversas maneiras de purificar pectinases a partir de fungos filamentosos. Algumas das metodologias envolvem várias etapas de cromatografias de filtração em gel e de troca iônica (CELESTINO et al., 2006; PEDROLLI; CARMONA, 2010; GLINKA; LIAO, 2011; SIDDIQUI et al., 2012) e outras simplesmente purificam, com bons rendimentos, só com uma etapa cromatográfica (THAKUR et al., 2010).

Pectinases fúngicas têm sido purificadas com aparente homogeneidade com diferentes rendimentos de purificação (GUMMADI; PANDA, 2003; CELESTINO et al., 2006). Pedrolli e Carmona (2010) purificaram uma exopoligalacturonase do *A. giganteus* com uma etapa simples de cromatografia de troca aniônica – Sephadex DEAE A-50 com um rendimento de 86,4% da atividade pectinolítica inicial. Uma exopoligalacturonase proveniente do cultivo de *Paecilomyces variotii* em meio líquido Czapeck com 1% de pectina cítrica como fonte de carbono, foi purificada com 47,2% de rendimento utilizando uma coluna DEAE-Fractogel (DAMÁSIO et al., 2010). Uma poligalacturonase produzida pelo fungo *Mucor circinelloides* foi purificada em uma coluna de filtração em gel, Sephacryl S-100 com 3,4% de rendimento (THAKUR et al., 2010).

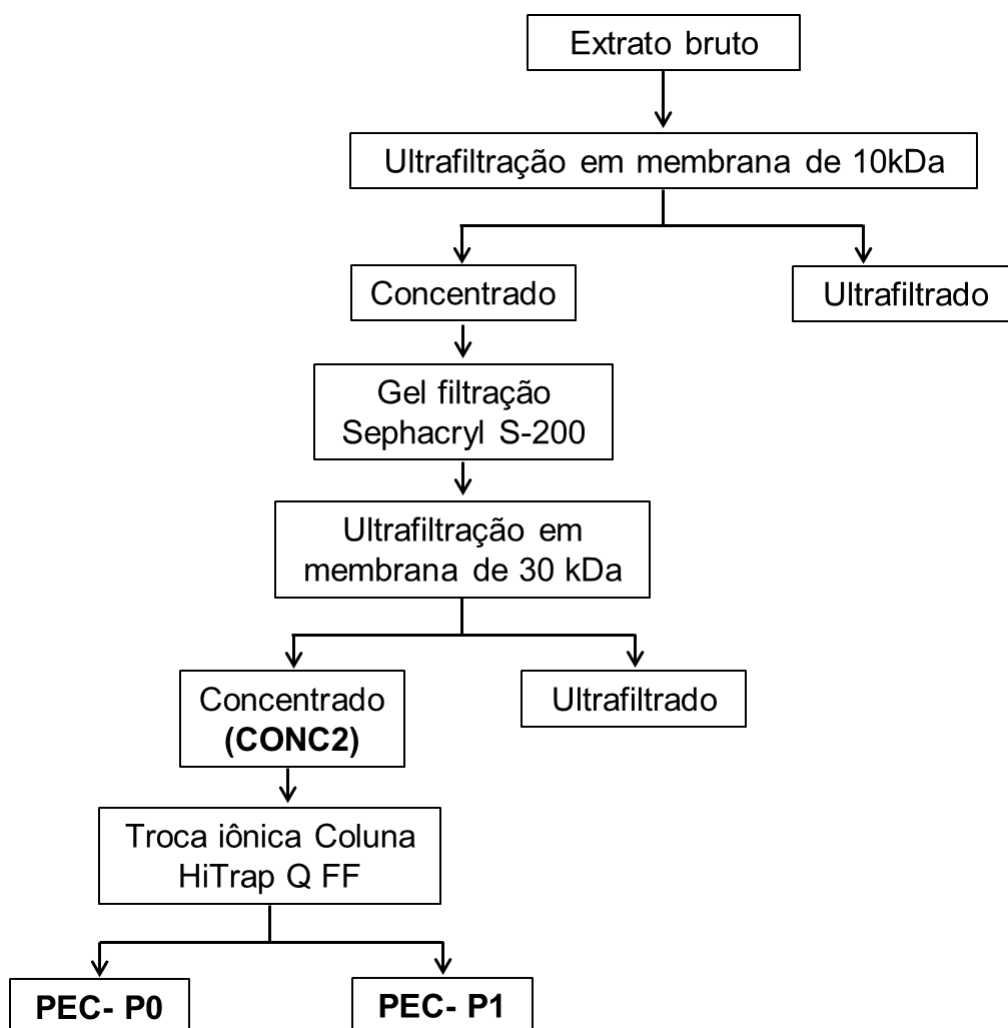


Figura 23. Fluxograma das etapas de purificação parcial da PEC-P1.

4.6. Eletroforese – SDS-PAGE e Zimograma

Os perfis protéicos da fração PEC-P1, extrato bruto e do concentrado foram determinados por eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%) e atividade de pectinase através do zimograma com uma previa precipitação com TCA 10% (p/v). A multiplicidade de proteínas das amostras foi evidenciada com várias bandas formadas no gel de eletroforese (Figura 24).

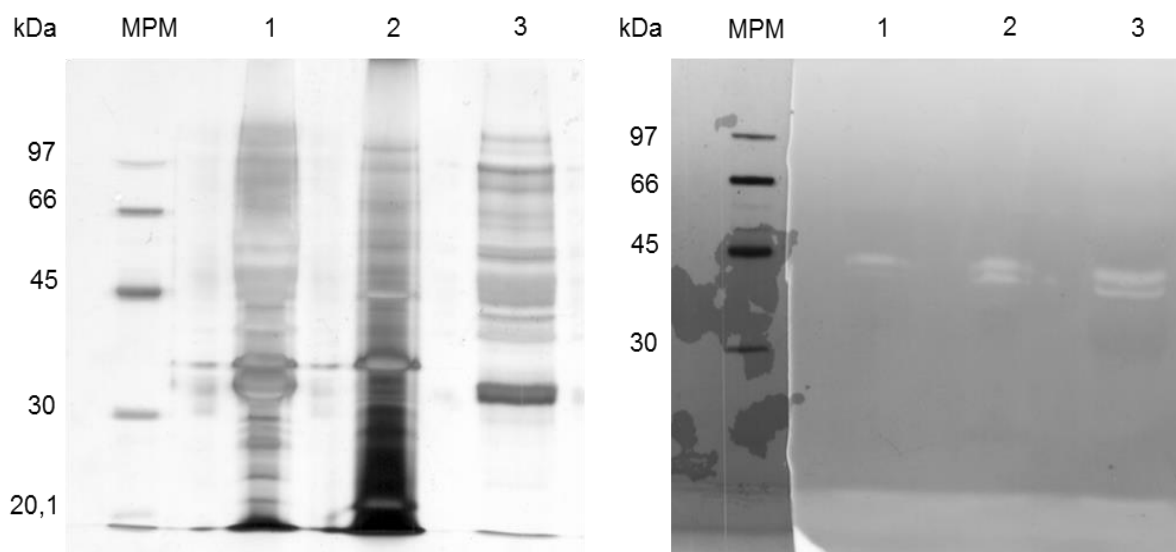


Figura 24. Gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%) (A.) e zimograma (B.) 1. Extrato bruto; 2. Concentrado; 3. PEC-P1.

O zimograma das amostras apresentou duas bandas de atividade de pectinase com massas moleculares aparentes de 43 e 45 kDa. As massas moleculares observadas são condizentes com as relatadas na literatura de diferentes pectinases isoladas e purificadas de fungos e bactérias. A diversidade de massas moleculares de pectinases purificadas variam de 35 até 115 kDa (KHANH et al., 1991; KOBAYASHI et al., 2001; ANGAYARKANNI et al., 2002; D’HALLEWIN et al., 2004; KLUG-SANTNER et al., 2006; SINITSYNA et al., 2007; JACOB et al., 2008; DAMÁSIO et al., 2010; SIDDIQUI et al., 2012).

4.7. Caracterização da pectinase parcialmente purificada

Para uma possível aplicação industrial desta enzima é necessária a avaliação das propriedades bioquímicas e a especificidade pelo substrato. A especificidade da enzima PEC-P1 foi avaliada por meio de ensaio de hidrólise de diversos substratos (Tabela 8). A enzima não apresentou atividade xilanolítica.

Tabela 8. Especificidade pelo substrato da PEC-P1.

Substrato	Atividade pectinolítica (UI/mL)	Atividade específica (UI/mg)
Pectinase	0,105 ± 0,005	6,57
Xilanase	0,000	0,00
Mananase	0,289 ± 0,008	18,07
CMC	0,132 ± 0,017	8,25

Com relação à temperatura, foram observados dois picos de atividade de pectinase, sendo um a 55°C e outro entre 70° e 75°C (Figura 25A) e no pH, foi observada maior atividade na faixa ácida (tampão acetato de sódio – 50 mM), tendo maior efeito em pH 4,5 (Figura 25B). A presença de dois picos de atividade de pectinase na Figura 25A é um dado que pode ser corroborado com o resultado obtido no zimograma (Figura 24), onde fica clara a presença de duas pectinases de diferentes massas moleculares, sugerindo que cada banda apresente uma maior atividade em uma determinada temperatura.

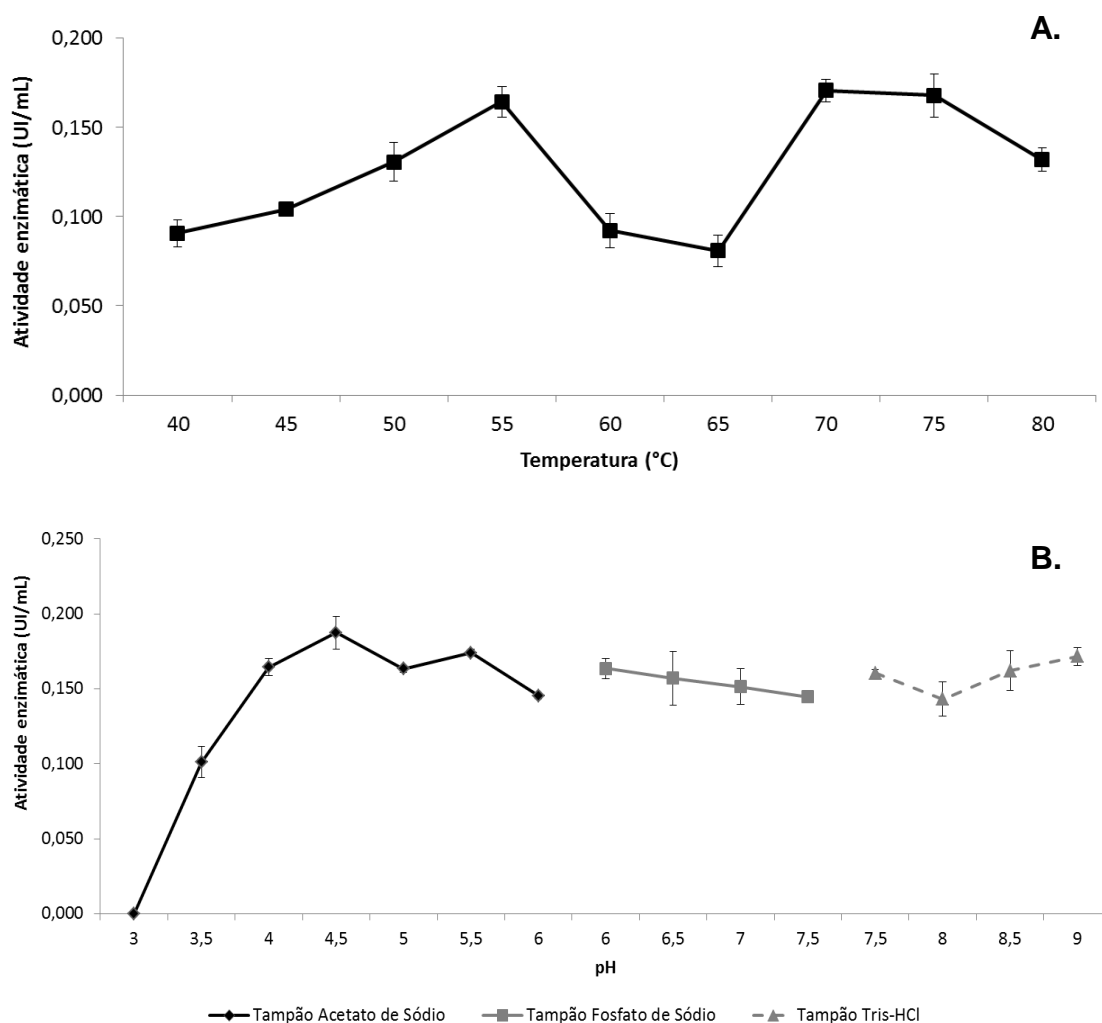


Figura 25. Efeito da temperatura (A) e do pH (B) na atividade pectinolítica da PEC-P1.

Outros estudos envolvendo caracterização de pectinases ácidas de *Aspergillus* são condizentes com a temperatura e o pH da PEC-P1 do *A. oryzae*. Nesse gênero, as pectinases são mais ativas em pH 3,5 a 6,5 e no intervalo de temperatura 30°C e 60°C (CHRISTGAU et al., 1996; ANGAYARKANNI et al., 2002; MALVESSI et al., 2004; AROTUPIN et al., 2008).

A enzima parcialmente purificada foi submetida a ensaios de termoestabilidade (Figura 26) nos quais foi dosada a atividade residual de pectinase após um período de incubação a 55°C e 70°C. Após 30 minutos de incubação, a atividade enzimática da PEC-P1 foi reduzida em 80,48% e 61,40% a 55°C e 70°C,

respectivamente. Aos 60 minutos de incubação a 70°C a atividade pectinolítica da PEC-P1 foi reduzida em 80,71%.

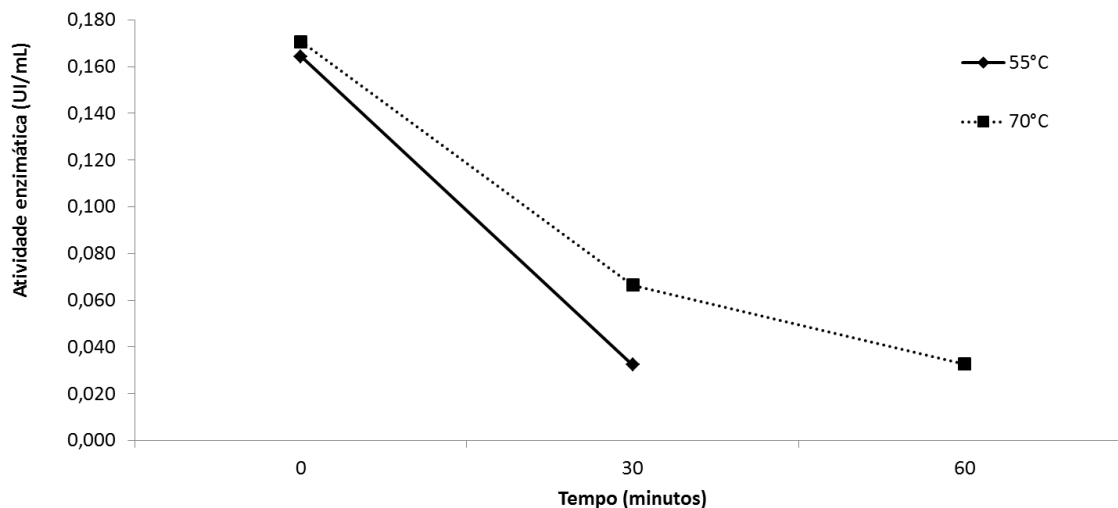


Figura 26. Termoestabilidade da PEC-P1.

De forma geral, o extrato bruto e o concentrado mostraram-se mais estáveis ao longo do tempo nas temperaturas de maior atividade enzimática do que a enzima parcialmente purificada. Isto pode ser devido à presença de moléculas com atividade estabilizadora da atividade enzimática presente nos extratos brutos e no concentrado que foram removidas durante os processos de purificação.

A função de ativação ou inibição de compostos químicos ou íons constitui uma ferramenta de grande utilidade na caracterização da estrutura e as possíveis interações que ocorrem no sítio ativo e o mecanismo de ação de enzimas pectinolíticas. Desta forma, o efeito de íons metálicos e do EDTA na atividade de PEC-P1 foi determinado, conforme mostrado na Tabela 9.

Tabela 9. Efeito de íons metálicos e EDTA na atividade pectinolítica da PEC-P1.

Íons metálicos e EDTA	Atividade pectinolítica (UI/mL)	Atividade Relativa (%)	Atividade pectinolítica (UI/mL)	Atividade Relativa (%)
	1mM (UI/mL)		10mM (UI/mL)	
Controle	0,104 ± 0,023	100,00	0,106 ± 0,026	100,00
MgSO ₄	0,108 ± 0,006	103,84	0,097 ± 0,012	91,50
AgNO ₃	0,000 ± 0,010*	0,00	0,000 ± 0,006*	0,00
FeSO ₄	0,118 ± 0,009	113,46	0,000 ± 0,026*	0,00
CaCl ₂	0,100 ± 0,010	96,15	0,070 ± 0,010	66,03
FeCl ₃	0,084 ± 0,018	80,76	0,000 ± 0,005*	0,00
CuSO ₄	0,152 ± 0,084	146,15	0,151 ± 0,006*	142,45
EDTA	0,101 ± 0,009	97,11	0,000 ± 0,002*	0,00
CoCl ₂	0,105 ± 0,017	100,96	0,000 ± 0,045*	0,00
MgCl ₂	0,079 ± 0,016	75,96	0,115 ± 0,003	108,49
ZnCl ₂	0,108 ± 0,029	103,84	0,078 ± 0,100	73,58
KCl	0,108 ± 0,005	103,84	0,122 ± 0,011	115,09
NaCl	0,093 ± 0,038	89,42	0,127 ± 0,008	119,81
ZnSO ₄	0,091 ± 0,002	87,50	0,111 ± 0,009	104,71
CuCl ₂	0,111 ± 0,007	106,73	0,000 ± 0,015*	0,00
MnCl ₂	0,095 ± 0,007	91,34	0,140 ± 0,030	132,07
HgCl ₂	0,101 ± 0,006	97,11	0,073 ± 0,008*	68,86

* Indica diferença estatística no teste ANOVA One way e post-hoc teste Tukey de comparação pareada, com nível de significância de 0,05%.

A PEC-P1 foi completamente inativada quando incubada com Ag⁺ nas concentrações 1 mM e 10 mM e pelos íons Cu²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Co²⁺ e EDTA na concentração 10 mM. O efeito inibitório de Cu²⁺, Fe²⁺ e Co²⁺ foram relatados para vários tipos de pectinases produzidas por fungos e bactérias, entre eles, *Acrophialophora nainiana* (CELESTINO et al., 2006), *Pleurotus ostreatus* (RASHAD et al., 2011), *Bacillus* sp. (KASHYAP et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2001), *Bacillus pumilus* (KLUG-SANTNER et al., 2006).

Os íons Ca^{2+} e Hg^{2+} , na concentração de 10 mM, inibiram, respectivamente, em 33,96% e 31,14% a atividade enzimática.

Por outro lado, o íon Cu^{2+} , ativou a enzima em 46,15% e 42,45%, na concentração 1 mM e 10 mM, respectivamente. Esta ativação também foi observada com o íon Mn^{2+} o qual ativou a enzima em 32,07% na concentração 10 mM. Os íons Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} tiveram pouco ou nenhum efeito na atividade pectinolítica.

O pré-tratamento da biomassa gera compostos fenólicos solúveis que têm ação inibitória e dificultam tanto a hidrólise enzimática quanto a fermentação de açúcares. Segundo Ximenes e colaboradores (2011), a inibição se dá quando a ação do composto fenólico sobre a enzima ocorre imediatamente após o contato da enzima com o composto. A Tabela 10 apresenta o efeito dos compostos fenólicos testados na atividade enzimática da PEC-P1.

Tabela 10. Efeito de compostos fenólicos na atividade pectinolítica da PEC-P1.

Compostos fenólicos (1 mg/mL)	Atividade pectinolítica (UI/mL)	Atividade Relativa (%)
Controle água	0,142 ± 0,010	100,00
Controle etanol	0,091 ± 0,006	100,00
Vanilina ^a	0,000 ± 0,000*	0,00
Ácido tânico ^a	0,000 ± 0,000*	0,00
Ácido ferúlico ^e	0,176 ± 0,016*	193,40
Ácido ρ - coumárico ^e	0,088 ± 0,005	96,70
Ácido cinâmico ^e	0,149 ± 0,004*	163,73
Ácido 4-Hidroxibenzóico ^e	0,166 ± 0,004*	182,41

* Indica diferença estatística no teste ANOVA One way e post-hoc teste Tukey de comparação pareada, com nível de significância de 0,05%. ^a Diluído em água; ^e Diluído em etanol.

O etanol por si só, teve influência negativa na atividade enzimática, inibindo 35,91% da atividade inicial da enzima. A concentração usada dos compostos fenólicos (1mg/mL) não teve interferência na curva de DNS.

O teste de ANOVA One Way dos dados mostrou que os compostos fenólicos, ácido tânico e vanilina, apresentam ação inibitória estatisticamente significativa sobre a atividade enzimática. Já os ácidos 4-Hidroxibenzóico, cinâmico e ferúlico ativaram a enzima. O ácido p-coumárico não teve diferença estatística do controle. Dados na literatura reportam a inibição de enzimas pectinolíticas pela vanilina (MEHTA; MEHTA, 1989) e pelo ácido tânico (HATHWAY; SEAKINS, 1958). Os taninos são considerados potentes inibidores de enzimas devido, em parte, à formação de complexos substrato-tanino (TEJIRIAN et al., 2011). Na literatura, existem poucos relatos da ativação de pectinases por compostos fenólicos.

4.8. Avaliação da viscosidade

A diminuição da viscosidade é uma técnica amplamente utilizada para estimar a atividade de enzimas pectinolíticas (MAIORANO et al., 1976). O concentrado e a PEC-P1 foram avaliados quanto à capacidade de reduzir a viscosidade do suco de goiaba (Tabela 11). O pH inicial do suco de goiaba foi de 3,9.

Tabela 11. Avaliação da viscosidade do suco de goiaba após tratamento enzimático.

Amostra	Controle (cP)	Após tratamento (cP)
0,2% p/v		
Concentrado	1036,5 ± 5,29	1046,5 ± 15,55
PEC-P1	426,17 ± 32,21	447,83 ± 3,55
0,5% p/v		
Concentrado	1084,0 ± 23,50	1039,0 ± 10,00*
PEC-P1	731,50 ± 16,89	772,17 ± 6,33*

* Indica diferença estatística no teste ANOVA One way e post-hoc teste Tukey de comparação pareada, com nível de significância de 0,05%.

Dos tratamentos avaliados, o concentrado, em uma concentração de 0,5% (v/v) reduziu em 4,15% a viscosidade do suco de goiaba. O tratamento com a PEC-P1 em nenhuma das concentrações testadas teve efeito positivo na redução da viscosidade. Na indústria de sucos, as pectinases desempenham um papel crucial

na clarificação, na extração e na redução da viscosidade (PRETEL et al., 1997; RODRIGUEZ-NOGALES et al., 2008). No suco de goiaba, as pectinases são utilizadas para reduzir a turbidez (KASHYAP et al., 2001) e auxiliar na hidrólise da pectina provocando uma redução da viscosidade da polpa e um aumento significativo no rendimento do suco (CHOPDA; BARRETT, 2001). Alzate e Vargas (2002) avaliaram o efeito da pectinase livre ou imobilizada na redução da viscosidade do suco de goiaba determinando que a enzima em estado livre reduziu em 92,34% a viscosidade do suco após 2 horas de incubação.

Conforme Chopda e Barrett (2001), Kaur e colaboradores (2011) e Surajban (2012) a viscosidade do suco de goiaba diminui com o aumento da concentração de enzima. A degradação da pectina por enzimas leva à redução da capacidade de retenção de água e por tanto, a água livre é liberada ao suco promovendo a redução da viscosidade.

O uso de complexos enzimáticos nos processos industriais permite uma atuação sinérgica, acelerando assim a hidrólise dos substratos. Na produção de sucos, o efeito sinérgico da combinação de pectinases, celulasas e hemicelulasas é um processo crucial no tratamento enzimático da polpa para uma quase completa liquefação das frutas e dos vegetais (JAYANI et al., 2005). A alta concentração e a diversidade enzimática do concentrado produzido a partir do cultivo do *A. oryzae* em casca de maracujá-amarelo torna-o um candidato com potencial para aplicação na indústria de sucos.

5. Conclusões

- O fungo *A. oryzae* mostrou-se eficiente na produção de diferentes tipos de holocelulasas quando cultivado em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono.
- *A. oryzae* produz vários tipos de pectinases quando cultivado em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono.

- As pectinases parcialmente purificadas apresentam características de pH e temperatura apropriadas para uma futura aplicação industrial.
- O concentrado diminuiu a viscosidade do suco de goiaba em um 4,15%.

6. Perspectivas

- Quantificar a biomassa fúngica presente no cultivo pelo método do ergosterol.
- Purificar e caracterizar as pectinases parcialmente purificadas.

Referências bibliográficas

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na biodegradação de materiais lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlatas. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1729–1738, 2011.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes : a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 21–28, 1998.

ALZATE, L. R. R.; VARGAS, F. J. A. **Inmovilizacion de pectinasas y/o celulasas y determinacion de algunos de sus efectos en el jugo de guayaba**, 2002. Universidad Nacional de Colombia.

ANGAYARKANNI, J.; PALANISWAMY, M.; MURUGESAN, S.; SWAMINATHAN, K. Improvement of tea leaves fermentation with *Aspergillus* spp. pectinase. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 94, n. 4, p. 299–303, 2002.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1586–1595, 2009.

AROTUPIN, D. J.; AKINYOSOYE, F. A.; ONIFADE, A. K. Purification and characterization of pectinmethylesterase from *Aspergillus repens* isolated from cultivated soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1991–1998, 2008.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93–99, 1987.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 1976.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. DE P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012.

CELESTINO, S. M. C.; MARIA DE FREITAS, S.; JAVIER MEDRANO, F.; VALLE DE SOUSA, M.; FILHO, E. X. F. Purification and characterization of a novel pectinase from *Acrophialophora nainiana* with emphasis on its physicochemical properties. **Journal of biotechnology**, v. 123, n. 1, p. 33–42, 2006.

CHOPDA, C. A.; BARRETT, D. M. Optimization of guava juice and powder production. **Journal of Food Processing Preservation**, v. 25, n. 530, p. 411–430, 2001.

CHRISTGAU, S.; KOFOD, L. V.; HALKIER, T.; et al. Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzyme. **Biochemical Journal**, v. 319, p. 705–712, 1996.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: F. G. Faleiro; N. T. V. Junqueira; M. F. Braga (Eds.); **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. p.677, 2005. Planaltina - DF: Embrapa Cerrados.

CRUICKSHANK, R. H.; WADE, G. C. Detection of pectic enzymes in pectin-acrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v. 107, n. 1, p. 177–81, 1980.

D’HALLEWIN, G.; SCHIRRA, M.; POWELL, A. L. T.; GREVE, L. C.; LABAVITCH, J. M. Properties of a polygalacturonase-inhibiting protein isolated from “Oroblanco” grapefruit. **Physiologia plantarum**, v. 120, n. 3, p. 395–404, 2004.

DAMÁSIO, A. R. DE L.; SILVA, T. M. DA; MALLER, A.; et al. Purification and partial characterization of an exo-polygalacturonase from *Paecilomyces variotii* liquid cultures. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, n. 5, p. 1496–507, 2010.

DUARTE, G.; MOREIRA, L.; GÓMEZ-MENDOZA, D.; et al. Use of Residual Biomass from the Textile Industry as Carbon Source for Production of a Low-Molecular-Weight Xylanase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 754–772, 2012.

FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: E. ESPOSITO; J. L. AZEVEDO (Eds.); **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Segunda ed., p.215–245, 2010. Caxias do Sul: EDUCS.

FERREIRA, P.; PENA, S.; ESTUDOU-SE, R.; et al. Estudo da secagem da casca do maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 91, p. 15–28, 2010.

FILHO, E. X. F.; PULS, J.; COUGHLAN, M. P. Biochemical characteristics of two endo-B-1,4-xylanases produced by *Penicillium capsulatum*. **Journal of industrial microbiology**, v. 11, p. 171–180, 1993.

GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: E. ESPOSITO; J. L. AZEVEDO (Eds.); **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Segunda ed., p.125–173, 2010. Caxias do Sul: EDUCS.

GLINKA, E. M.; LIAO, Y.-C. Purification and partial characterisation of pectin methylesterase produced by *Fusarium asiaticum*. **Fungal biology**, v. 115, n. 11, p. 1112–21, 2011. Elsevier Ltd.

GUMMADI, S. N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 987–996, 2003.

GUO, C.-T.; XUE, W.-M.; CHEN, T.-B.; DENG, W.-H.; RAO, P.-F. Purificacaion and Partial characterization of an endo-polygalacturonase from *Asperillus niger*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 26, p. 253–265, 2002.

HAMMER, O.; HARPER, A. T. D.; RYAN., P. D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Paleontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2001.

HATHWAY, D. E.; SEAKINS, J. W. The influence of tannins on the degradation of pectin by pectinase enzymes. **The Biochemical journal**, v. 70, n. 1, p. 158–63, 1958.

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 409–18, 2002.

ISMAIL, A.-M. S. Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 7, p. 645–650, 1996.

JACOB, N.; ASHA POORNA, C.; PREMA, P. Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. **Bioresource technology**, v. 99, n. 14, p. 6697–701, 2008.

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

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228–240, 2013. Elsevier Ltd.

KARNOVSKY, M. . A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137–138A, 1965.

KASHYAP, D. R.; CHANDRA, S.; KAUL, A.; TEWARI, R. Production , purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp . DT7. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 277–282, 2000.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource technology**, v. 77, n. 3, p. 215–27, 2001.

KAUR, S.; SARKAR, B. C.; SHARMA, H. K.; SINGH, C. Response Surface Optimization of Conditions for the Clarification of Guava Fruit Juice Using Commercial Enzyme. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, n. 4, p. 1298–1318, 2011.

KHAN, H. U. The role of ion exchange chromatography in purification and characterization of molecules. In: A. Kilislioglu (Ed.); **Ion Exchange Technologies**, 2012. InTech.

KHANH, N. Q.; RUTTKOWSKI, E.; LEIDINGER, K.; et al. Characterization and expression of a genomic pectin methyl esterase-encoding gene in *Aspergillus niger*. **Gene**, v. 106, p. 71–77, 1991.

KLUG-SANTNER, B. G.; SCHNITZHOFFER, W.; VRSANSKÁ, M.; et al. Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. **Journal of biotechnology**, v. 121, n. 3, p. 390–401, 2006.

KOBAYASHI, T.; HIGAKI, N.; SUZUMATSU, A.; et al. Purification and properties of a high-molecular-weight, alkaline exopolysaccharidase from a strain of *Bacillus*. **Enzyme and microbial technology**, v. 29, n. 1, p. 70–75, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LEI, Z.; BI, S.; HU, B.; YANG, H. Combined magnetic and chemical covalent immobilization of pectinase on composites membranes improves stability and activity. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 889–896, 2007.

LI, S.; XU, S.; LIU, S.; YANG, C.; LU, Q. Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas. **Fuel Processing Technology**, v. 85, n. 8-10, p. 1201–1211, 2004.

LIN, L.; YAN, R.; LIU, Y.; JIANG, W. In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. **Bioresource technology**, v. 101, n. 21, p. 8217–23, 2010. Elsevier Ltd.

MAIORANO, A. E. E.; OGAKI, Y.; SCHMIDELL, W.; MAIORANO, E.; MATERIALS, D. Short Communication: Determination from different microorganisms of the

enzymatic activity of pectinases. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 355–356, 1976.

MALLER, A. **Produção, Purificação e Caracterização do Complexo Pectinolítico do Fungo *Aspergillus niveus***, 2008.

MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M. DA; MOURA, M. Influence of Medium Composition and pH on the Production of Polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 5, p. 693–702, 2004.

MEHTA, A.; MEHTA, P. Phenolic compounds: Inhibitory agents of cell wall degrading enzymes by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium moniliforme* in vitro. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, v. 144, n. 8, p. 571–579, 1989.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577–99, 2000.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

NACZK, M.; NICHOLS, T.; PINK, D.; SOSULSKILL, F. Condensed Tannins in Canola Hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 2196–2200, 1994.

PEDROLI, D. B.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 567–73, 2010.

PRETEL, M. T.; LOZANO, P.; RIQUELME, F.; ROMOJARO, F. Pectic enzymes in fresh fruit processing: optimization of enzymic peeling of oranges. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 43–49, 1997.

RASHAD, M. M.; ABDU, H. M.; SHOUSA, W. G. H.; ALI, M. M.; EL-SAYED, N. N. Purification and Characterization of the Pectin Lyase Produced by *Pleurotus ostreatus* Grown on Lemon Pulp Waste. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 8, p. 1377–1384, 2011.

RIBEIRO, D. S.; HENRIQUE, S. M. B.; OLIVEIRA, L. S.; MACEDO, G. A.; FLEURI, L. F. Enzymes in juice processing: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 4, p. 635–641, 2010.

RODRIGUEZ-NOGALES, J. M.; ORTEGA, N.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M. D. Pectin hydrolysis in a free enzyme membrane reactor: An approach to the wine and juice clarification. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 112–119, 2008.

RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A. R.; VOLPE, C. A.; et al. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Brasília - DF: Embrapa - Publicações Técnicas Frupex, 19, 1996.

SEIXAS, F. L.; FUKUDA, D. L.; TURBIANI, F. R. B.; et al. Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 186–192, 2014.

SIDDIQUI, M. A.; PANDE, V.; ARIF, M. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Rhizomucor pusillus* Isolated from Decomposting Orange Peels. **Enzyme research**, v. 2012, 2012.

SINITSYNA, O. A.; FEDOROVA, E. A.; SEMENOVA, M. V.; et al. Isolation and characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens*. **Biochemistry**, v. 72, n. 5, p. 565–71, 2007.

SIQUEIRA, F. G. DE; SIQUEIRA, E. G. DE; JARAMILLO, P. M. D.; et al. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 20–26, 2010.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. . S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 205–218, 2003.

SURAJBHAN, S.; ALKA, S.; CHETAN, J.; LAMBERT, R. Extraction and Optimization of Guava Juice by Using Response Surface Methodology. **American Journal of Food Technology**, v. 7, n. 6, p. 326–339, 2012.

TEJIRIAN, A.; XU, F.; ANI TEJIRIAN. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 3, p. 239–247, 2011. Elsevier Inc.

THAKUR, A.; PAHWA, R.; SINGH, S.; GUPTA, R. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. **Enzyme research**, v. 2010, p. 170549, 2010.

UENOJO, M.; PASTORE, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 388–394, 2007.

VALE, L. H. F. DO. **Regulação da produção de enzimas celulolíticas por fungos em resposta a efetores metabólicos**, 2012. Universidade de Brasília.

VRIES, R. P. DE; VISSER, J. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 65, n. 4, p. 497–522, 2001.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 1, p. 54–60, 2011. Elsevier Inc.

CAPITULO 3

USO DE PECTINASES PRODUZIDAS PELO FUNGO *Aspergillus oryzae* NO PROCESSO DE BIOPURGA DA INDÚSTRIA TÊXTIL

Resumo

Uma amostra concentrada de pectinase, isolada do extrato bruto proveniente do cultivo do fungo *A. oryzae* em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono, foi testada no processo de biopurga da indústria têxtil. As avaliações da intensidade colorística (K/S), da umectabilidade do tecido e as imagens por MEV mostraram que a pectinase de *A. oryzae* foi mais eficaz do que a enzima comercial Viscozyme[®] L e menos eficaz do que a purga alcalina e uma amostra comercial de pectatos lyase (Quimilase[®] HPS). A análise por microscopia eletrônica de varredura após tratamentos enzimáticos e alcalino mostrou que a amostra de pectinase de *A. oryzae* foi responsável por poucas alterações da fibra de algodão.

Palavras-chave: Casca de maracujá-amarelo, pectinase, biopurga.

Abstract

A concentrated pectinase, isolated from crude extract samples of the mesophilic fungus *Aspergillus oryzae* grown on passion fruit peel as the carbon source, was tested in the process of biopurga of the textile industry. The evaluations of coloristic intensity evaluation (K/S), the wettability of the fabric and the SEM images showed that the pectinase from *A. oryzae* was more effective than the commercial enzyme Viscozyme[®] L and less effective than commercial alkaline pectate lyase preparation (Quimilase[®] HPS) and alkaline purge. The analysis of scanning electron microscopy studies after enzymatic and alkali treatments showed that the pectinase sample of *A. oryzae* was responsible for few changes in the surface of the cotton fibers.

Keywords: Yellow passion fruit peel, pectinase, bioscouring

1. Introdução

O algodão é a forma mais pura de celulose encontrada na natureza, sendo uma fibra de origem vegetal proveniente de espécies pertencentes ao gênero *Gossypium* (SHORE, 1995). Do ponto de vista estrutural, as fibras de algodão podem ser diferenciadas em: cutícula, parede primária, parede secundária e lúmen (Figura 27). Estas camadas são estruturalmente e quimicamente diferentes entre si, e contêm cerca de 10% em peso de substâncias não celulósicas, tais como lipídeos, ceras, substâncias pécnicas, ácidos orgânicos e proteínas. (LI; HARDIN, 1997, 1998; HARDIN, IAN R et al., 1998).

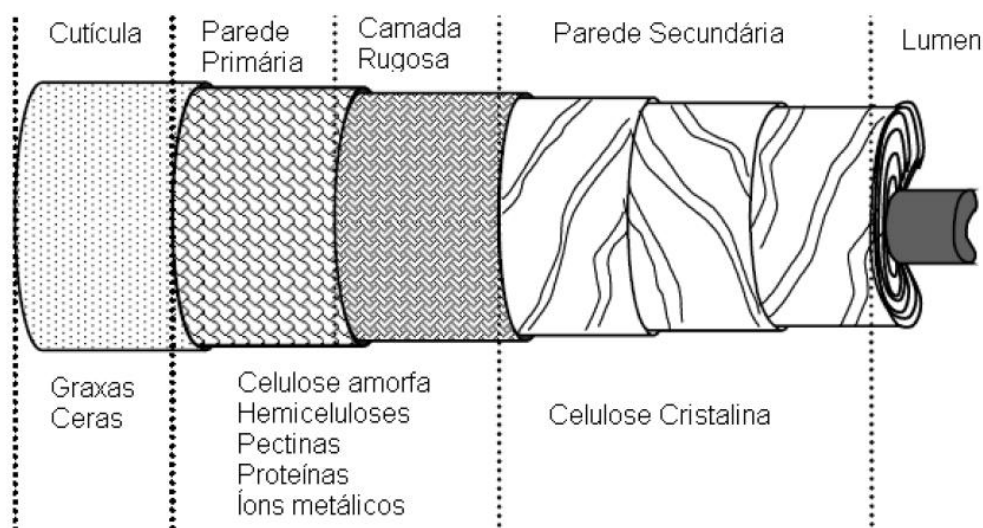


Figura 27. Estrutura de fibra de algodão. Adaptado de Agrawal (2005)

As etapas anteriores ao tingimento das fibras tais como desengomagem, purga e alvejamento têm como objetivo prepará-las para o tingimento e acabamento, ou seja, são as etapas encarregadas de remover as impurezas tais como ceras e pectina, que afetam negativamente a capacidade de absorção do tecido (KARAPINAR; SARIISIK, 2004). Tais etapas levam a um aumento da umectabilidade, permitindo uma melhor acessibilidade do corante à fibra (ANDREAUS; CAVACO-PAULO, 2008). O processo de purga do algodão emulsiona as ceras e quebra a pectina em produtos solúveis e emulsionáveis que, posteriormente, são eliminados das fibras por meio de lavagens. Na indústria têxtil,

este processo tem sido tradicionalmente realizado com soluções alcalinas a temperaturas elevadas, exigindo alta demanda energética e de água, gerando efluentes ecologicamente indesejáveis por causa da sua elevada alcalinidade e demandas bioquímica e química de oxigênio (NIAZ et al., 2011).

Os processos têxteis que envolvem a aplicação de enzimas incluem a desengomagem (amilases, lipases), purga (pectinases, proteases, celulases), alvejamento (lacases, catalases), tingimento (catalases, fenol oxidases, peroxidases, azoredutases) e acabamentos (celulases, proteases e lacases) (ANDREAUS; CAVACO-PAULO, 2008).

A biopurga, *bioscouring* ou purga enzimática, refere-se à remoção enzimática de pectinas e ceras da superfície das fibras celulósicas. A pectina contribui para a hidrofobicidade do algodão cru e, sua degradação e eliminação, permite a fácil remoção, com a ajuda de surfactantes e agitação mecânica, das ceras, permitindo que o algodão seja hidrofílico sem a deterioração da fibra (CUI et al., 2009). Em contraste com as drásticas condições alcalinas comumente usadas, o processo com pectinases é realizado em condições mais brandas, não afetando as cadeias de celulose e assim evitando danos às fibras, além de apresentar menor consumo de energia e de produtos auxiliares têxteis, redução da carga poluente e do volume de efluentes (MOROZOVA et al., 2006; KLUG-SANTNER et al., 2006; ABDEL-HALIM et al., 2008; MONTEIRO et al., 2009; VIGNESWARANB et al., 2011; NIAZ et al., 2011).

Alguns dos problemas do uso das enzimas nos processos das indústrias têxtil são a compatibilidades delas com tensoativos iônicos, sensibilidade às mudanças de pH e de temperaturas e à presença de metais pesados (VIGNESWARANB et al., 2011)

2. Objetivo

Comparar os efeitos do extrato bruto concentrado de *A. oryzae* (BLU-37) quando crescido em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono com outras

enzimas de origem comercial, com e sem produtos auxiliares, no processo de biopurga da indústria têxtil.

3. Material e métodos

Este trabalho foi realizado na Universidade Regional de Blumenau (FURB) – Blumenau, SC – no laboratório de análise têxtil do departamento de Química sob a orientação do Professor Dr. Jürgen Andreus.

3.1. Concentrado, preparações comerciais e produtos auxiliares

Para avaliar uma aplicação industrial do concentrado conforme item 3.5 e 3.10 do capítulo 2, foi realizada um processo de biopurga comparando os resultados com amostras de duas enzimas comerciais: Viscozyme[®] L (cedida pela Novozymes S/A, Bagsvæd, Dinamarca) e a Quimilase[®] HPS (cedida pela Quimisa Brasil, Blumenau, SC).

Viscozyme[®] L é uma preparação comercial multienzimática produzida pelo fungo *A. aculeatus*, composta de celulasas, hemicelulasas e pectinases, tais como pectato liase, com atividade em pH ácido para tratamentos de materiais vegetais e biopurga de algodão (NOVOZYME, 2010). A Quimilase[®] HPS é um agente enzimático indicado para processos de bio-preparação sobre fibras celulósicas. O Tergitol[®] 15-S-12 e o Sandoclean[®] PCJ, surfactantes não-iônicos, adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, USA) e da Clariant S.A (Muttenz, Suíça), respectivamente.

A determinação da atividade pectinolítica, tanto do concentrado como das enzimas comerciais, foi feita conforme descrito no capítulo 2 item 3.6.

3.2. Biopurga

Os ensaios de biopurga foram realizados utilizando tecido cru, 100% algodão, meia malha (Jersey), com gramatura 171 g m^{-2} , densidade de 20-11 fios cm^{-1} na fileira e 14-15 laçadas cm^{-1} na coluna (fabricante Katêxtil – Pomerode, SC) com uma dimensão de 15 x 15 cm. Todos os tratamentos foram feitos na concentração de 1UI/g (atividade pectinolítica/grama de tecido) em triplicata em canecos de aço de 500 mL no equipamento Washtester modelo AT-7 da marca Kimak (Kimak Indústria e Comércio Máquinas Knihis Ltda. Brusque SC, Brasil) com agitação vertical de 40 rpm.

Inicialmente, todos os tecidos foram lavados três vezes, individualmente, com água a 95°C por 2 minutos cada sob agitação vertical, e posteriormente lavados com água destilada a 23°C por 15 minutos e secados ao ar livre, a 20°C .

Após o pré-tratamento, os tecidos foram tratados, de maneira individual, da seguinte maneira: a) enzima com tampão; b) enzima com tampão e SDS (2 g/L – 6,93 mM); c) enzima com tampão e EDTA (0,2 g/L – 0,684 mM); d) enzima com tampão, SDS e EDTA. Tecidos sem nenhum tratamento, somente pré-tratados e com purga alcalina foram utilizados como controles. A purga alcalina industrial foi feita com hidróxido de sódio (50 g/L) e surfactante não iônico Sandoclean[®] PCJ líquido (1g/L) a 80°C por 20 minutos. Após dos tratamentos enzimáticos, os tecidos foram lavados com água a 95°C por 5 minutos. Já os tecidos tratados com a purga alcalina foram lavados com ácido acético 1% (v/v) para neutralizar o efeito do NaOH.

Os tampões utilizados nos diferentes tratamentos foram fosfato de sódio (50 mM pH 7,0) para o concentrado, acetato de sódio (50 mM pH 5,0) para Viscozyme[®] L e Tris-HCl (50 mM pH 8,0) para Quimilase[®] HPS, de acordo com as especificações do fabricante.

3.3. Umectabilidade (Teste da Gota)

Os tecidos, previamente tratados, lavados e secos, foram avaliados quanto à umectabilidade pelo método de ensaio da AATCC número 27 (1977). O tempo (em segundos) entre o contato de uma gota de água, cuidadosamente depositado sobre a superfície do tecido, e o seu desaparecimento no interior da matriz de tecido foi registado como o tempo de umectabilidade. Cada tecido foi testado em pelo menos nove zonas diferentes e a média de tempo foi calculada. A temperatura da água foi 23°C.

3.4. Tingimento do tecido com vermelho de rutênio

Para estimar a concentração de substâncias pécnicas presentes nos tecidos, estes foram corados com o vermelho de rutênio (corante catiônico) (LI; HARDIN, 1997; HARDIN, IAN R et al., 1998; TRAORE; BUSCHLE-DILLER, 1999).

O tingimento foi realizado no equipamento da marca Mathis, modelo ALT - I - B (Aparelhos de Laboratório Mathis Ltda, Cotia, SP, Brasil) com aquecimento por infravermelho nas seguintes etapas (Figura 28): O tempo no patamar foi de 30 minutos a 50°C, com uma velocidade de rotação de 4 rpm alternando o sentido a cada 50 segundos. A temperatura de resfriamento foi de 45°C. A solução corante foi feita conforme protocolo modificado de Ahlawat e colaboradores (2009): 0,02% (p/v) vermelho de rutênio; 0,1% (p/v) cloreto de amônio (NH₄Cl); 0,25% (p/v) hidróxido de amônio (28% p/v); 0,1% (p/v) de Tergitol[®] 15-S-12.

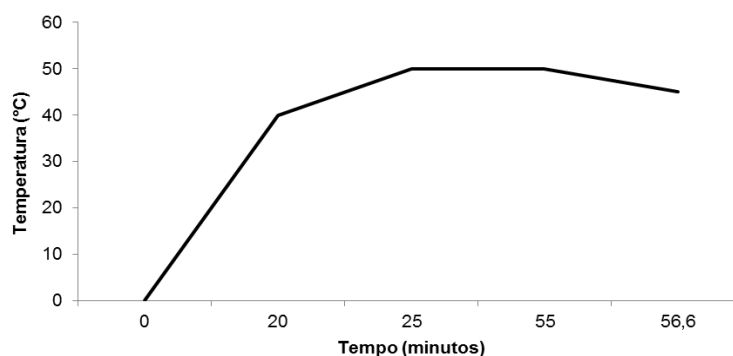


Figura 28. Etapas do tingimento realizado no banho de tingimento modelo Mathi ALT-1 com aquecimento por infravermelho.

Posteriormente, os tecidos foram lavados com água destilada até a total remoção de corante não fixado. Após esse processo, os tecidos foram pendurados e secados ao ar livre a 24°C. Após a secagem, determinou-se o valor de reflexão espectral (K/S) no espectrofotômetro de remissão Spectrophotometer modelo CM - 3610d da marca Konica Minolta (Konica Minolta Japão) em 540 nm. A intensidade colorística (K/S) foi obtida a partir da equação de Kubelka-Munke (KUBELKA, 1948):

$$K/S = \frac{(1 - R)^2}{2R}$$

onde: K corresponde à absorção de luz pelo corante, S à medida da difusão da luz pelo substrato e R ao valor da remissão.

3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os experimentos de microscopia eletrônica de varredura foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob a supervisão da Professora Dr. Sônia Nair Bão.

Frações de 0,5 x 0,5 cm do tecido previamente tratado e corado foram fixados no porta espécime (*stubs*) com fita de carbono dupla fase e revestido em câmara de

vácuo com vapores de ouro no a equipamento Balzers modelo SCD 050 (Balzers Union AG, Liechtenstein, Alemanha) e submetido a análise no microscópio eletrônico de varredura marca JEOL, modelo JSM-700 1F (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) a 15.0 kV.

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização enzimática

Atividades enzimáticas de pectinase (0,922 UI/mL), xilanase (0,543 UI/mL), mananase (0,442 UI/mL) e celulases, incluindo como CMCase (0,930 UI/mL) e FPase (0,539 UI/mL), foram detectadas no concentrado utilizado no processo de biopurga. A maior atividade pectinolítica foi em pH 7,0 e a 50°C. A meia vida a 50°C foi de 24 horas, conforme apresentado no capítulo 2.

No processo de biopurga existe uma maior procura pelas pectinases com atividade e estabilidade em condições alcalinas (pH 7,0 – 9,0). As pectato liases são as enzimas mais usadas neste processo (TZANOV et al., 2001; KLUG-SANTNER et al., 2006; JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013).

Na maioria dos processos industriais, como na biopurga na indústria têxtil, onde as enzimas estão inseridas, estas não apresentam um alto grau de pureza e são complexos multienzimáticos contendo pectinases, amilases, lipases, celulases e outras hemicelulases provenientes de fungos geneticamente melhorados. Moura (2009) avaliou a composição enzimática da Viscozyme[®] L, complexo enzimático bastante utilizado na indústria têxtil, encontrando pectinases tais como PG, PE, PL junto com amilases, celulases, xilanases e invertases. A composição da Quimilase[®] BP mediante eletroforese SDS-PAGE também demonstrou a mistura de pectinases com celulase, endoglucanases e outras proteínas (FERREIRA, 2012). Várias pesquisas demonstram maior eficiência no processo de biopurga quando as pectinases são misturadas com outras enzimas tais como celulases, proteases e

lipases (HARTZELL; HSIEH, 1998; KARAPINAR; SARIISIK, 2004; ABDEL-HALIM et al., 2008).

4.2. Umectabilidade (Teste da Gota)

Os resultados do teste de umectabilidade dos tecidos de algodão cru (tecido de malha), após os diferentes tratamentos de biopurga, estão demonstrados na Figura 29 e Tabela 12.

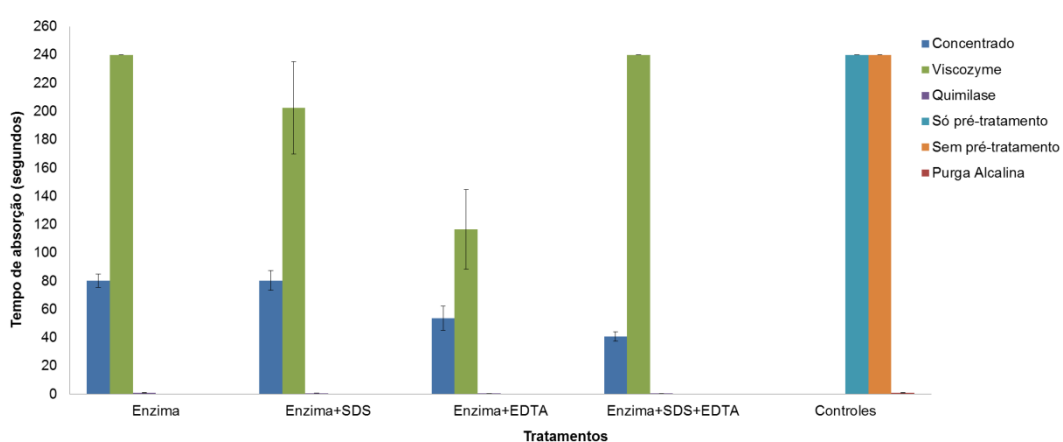


Figura 29. Tratamentos realizados com a biopurga. Valores da umectabilidade dos tecidos tratados determinada pelo teste da gota.

Os resultados obtidos no teste da gota pela enzima Viscozyme[®] L foram inferiores quando comparados com os obtidos pelo concentrado e pela enzima Quimilase[®] HPS e semelhantes aos encontrados nos tecidos só com pré-tratamento ou sem nenhum tratamento. Já os resultados obtidos com a enzima Quimilase[®] HPS foram semelhantes aos obtidos com a purga industrial. Os resultados obtidos com o concentrado foram satisfatórios, onde se visualiza uma diminuição da hidrofobicidade do tecido após o tratamento enzimático. A presença de celulases na amostra do concentrado pode ter ajudado na melhoria da umectabilidade dos tecidos. Hartzell e Hsieh (1998) avaliaram a alteração da umectabilidade de tecidos de algodão quando tratados com pectinase, celulase, proteases e lipases determinando que quando as enzimas agiram de maneira individual, os tecidos

apresentaram pouca melhoria na umectação. A combinação de pectinases com celulases proporciona uma mudança significativa da umectabilidade dos tecidos.

A adição de EDTA e SDS nos tratamentos com o concentrado e a enzima comercial Quimilase[®] HPS (Tabela 12) contribuíram para uma diminuição do tempo de absorção. Várias pesquisas demonstram a eficiência da presença dos agentes tensoativos não iônicos no processo de biopurga (BUSCHLE-DILLER et al., 1998). Este comportamento foi diferente ao observado com a enzima comercial Viscozyme[®] L onde a presença desses produtos auxiliares não teve diferença entre os tratamentos. O uso de agentes quelantes é imprescindível nos processos de purga e biopurga, já que estes possuem a capacidade de sequestrar íons presentes nas fibras, evitando assim, problemas nos processos de tingimento, estamparia e acabamento. O EDTA contribui para a criação de zonas livres e acessíveis para a ação enzimática, indicando um efeito sinérgico entre estas (LOSONCZI et al., 2005).

Tabela 12. Dados do tempo de absorção (em segundos) dos tecidos previamente tratados

Tratamento	Tempo de absorção (segundos)		
	Concentrado	Quimilase [®] HPS	Viscozyme [®] L
Só enzima	80,00 ± 4,7	1,00 ± 0,0	240,00 ± 0,0
Enzima + SDS	80,00 ± 7,0	0,70 ± 0,0	185,00 +/- 32,7
Enzima + EDTA	54,00 ± 8,5	0,50 ± 0,0	107,00 +/- 28,2
Enzima + SDS + EDTA	41,00 ± 3,3	0,60 ± 0,1	230,00 +/- 0,0
Controle	Tempo de absorção (segundos)		
Só pré-tratamento	240,00 +/- 0,0		
Sem pré-tratamento	240,00 +/- 0,0		
Purga alcalina	1,10 +/- 0,1		

4.3. Reflexão espectral (K/S)

Os resultados dos tingimentos com vermelho de rutênio dos tecidos de algodão cru (tecido de malha), após os diferentes tratamentos, estão apresentados

na Figura 30 e Tabela 13 em forma de K/S. Este valor foi calculado a partir da refletância no comprimento de absorção máxima de 540 nm.

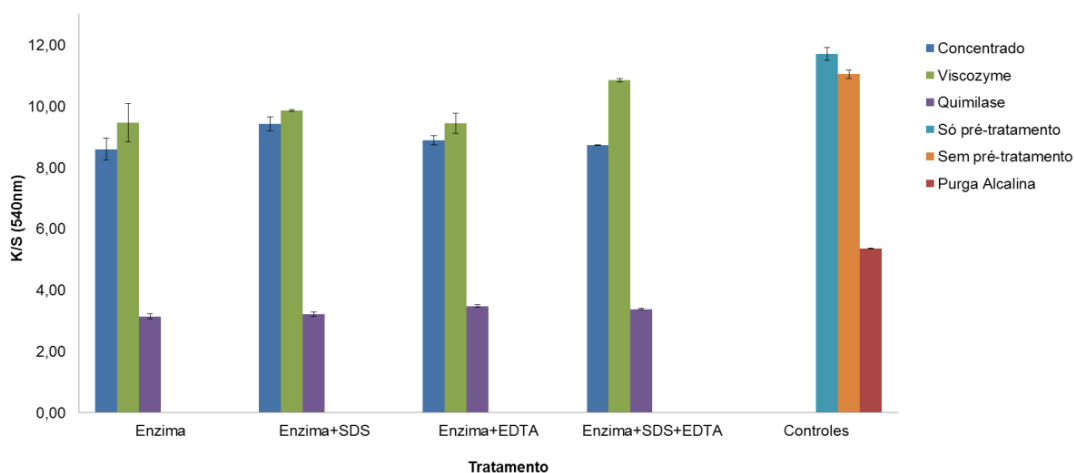


Figura 30. Tratamentos realizados com a biopurga. Dados de reflexão espectral (k/s) dos tecidos tingidos com vermelho de rutênio.

Tabela 13. Dados de reflexão espectral dos tecidos tratados e tingidos com vermelho de rutênio.

Tratamento	Reflexão Espectral (K/S)		
	Concentrado	Quimilase [®] HPS	Viscozyme [®] L
Só enzima	8,60 ± 0,4	3,14 ± 0,1	9,50 ± 0,6
Enzima + SDS	9,40 ± 0,2	3,21 ± 0,0	9,90 ± 0,0
Enzima + EDTA	8,90 ± 0,2	3,48 ± 0,0	9,40 ± 0,3
Enzima + SDS + EDTA	8,70 ± 0,0	3,38 ± 0,1	10,90 ± 0,1
Controle	Reflexão Espectral (K/S)		
Só pré-tratamento	11,71 ± 0,2		
Sem pré-tratamento	11,05 ± 0,1		
Purga alcalina	5,36 ± 0,0		

Os menores valores de K/S foram observados para os tratamentos com a enzima comercial Quimilase[®] HPS. Valores de K/S menores significam menor quantidade de corante catiônico presente no tecido e, conseqüentemente, menor quantidade de grupos aniônicos na fibra. Os resultados obtidos nos tratamento com

a enzima Viscozyme[®] L e o concentrado foram inferiores à purga alcalina e não apresentaram diferença com os tratamentos controles “só pré-tratamento” e “sem pré-tratamento”.

A presença do EDTA e do SDS (individualmente ou em conjunto) não teve nenhuma influência nos resultados da leitura do K/S (Figura 30) (Tabela 13). Segundo Li e Hardin (1998) a integração de um surfactante e um quelante na etapa de lavagem resulta em uma melhoria adicional da eficácia na remoção da pectina pela solubilização de ceras, facilitando o ataque das enzimas sobre esta, assim como sobre a hemicelulose e a celulose.

Os resultados obtidos com a enzima Viscozyme[®] L foram inferiores aos obtidos com os tratamentos do concentrado e da Quimilase[®] HPS. Resultados da umectabilidade e da reflexão espectral obtido com a enzima comercial Quimilase[®] HPS verificam a efetiva eliminação da pectina e de outros componentes que interferem na hidrofiliabilidade dos tecidos.

4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para visualizar o efeito dos cinco tratamentos (concentrado, Viscozyme[®] L, Quimilase[®] HPS, purga alcalina e tecido só pré-tratado) no tecido, micrografias foram obtidas por MEV como apresentado na Figura 31.

Na fibra sem tratamento enzimático, observam-se nervuras paralelas e sulcos suaves (Figura 31E) como relatado por Hardin e Li (1998). Estes autores avaliaram várias pectinases e celulasas comerciais no processo de biopurga através da determinação do K/S, da mudança na umectabilidade e por MEV encontrando diferenças estruturais das fibras após cada tratamento. Contrário ao observado na fibra sem tratamento, a purga alcalina (Figura 31D) apresenta uma ausência quase completa das estrias com cavidades desiguais pronunciadas indicando um efeito de descamação (*peeling*) sobre as impurezas não celulósicas além da presença de pequenas partículas adsorvidas sobre a superfície das fibras. Isto coloca em evidência a eliminação não só dos componentes de interesse, como a pectina, como

também da celulose e o alto consumo de água que deve ser utilizado para a eliminação total das substâncias alcalinas usadas no processo, já que todos os tecidos foram lavados exaustivamente após o tratamento.

Quando comparadas as fibras do tecido tratado com o concentrado (Figura 31A) e com as tratadas com a enzima comercial Viscozyme[®] L (Figura 31B) não se observa nenhuma diferença estrutural. As fibras tratadas com a enzima Quimilase[®] HPS (Figura 31C) apresentam fibras irregulares, com mais desgaste e com fissuras maiores. Estes resultados corroboram os dados obtidos na avaliação da umectabilidade e nos valores de K/S onde a Quimilase[®] HPS apresentou os melhores resultados.

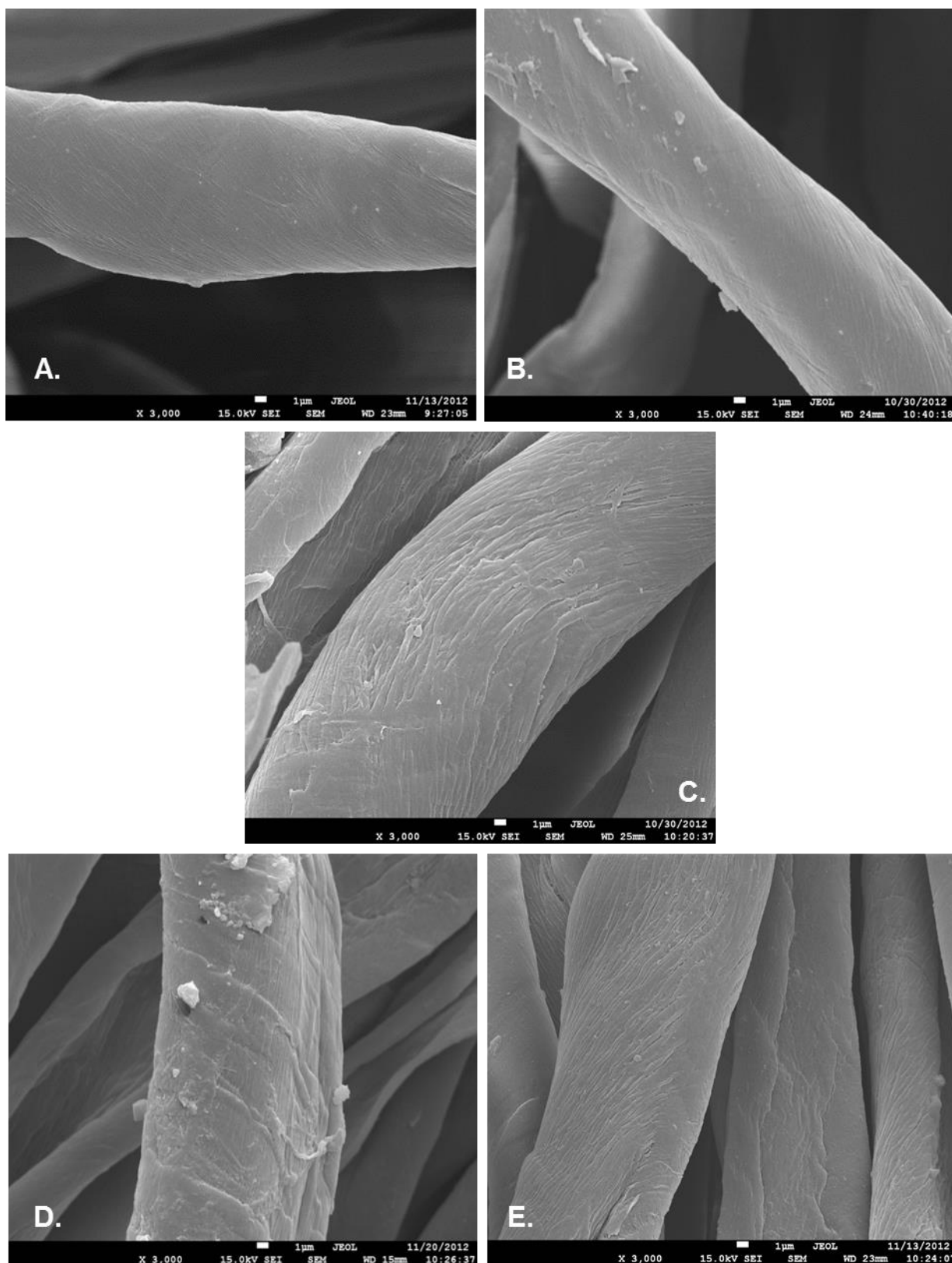


Figura 31. Micrografias dos tecidos mediante MEV. Aumento x3000. **A.** Concentrado; **B.** Viscozyme® L; **C.** Quimilase® HPS; **D.** Purga alcalina; **E.** só pré-tratamento.

As micrografias obtidas por MEV têm-se tornado uma ferramenta que possibilita o estudo das estruturas da fibra avaliando a eficácia, vantagens e/ou problemas tanto da purga alcalina quanto da biopurga (OUAJAI; SHANKS, 2005; ABDEL-HALIM et al., 2008; ZHANG et al., 2011).

Os resultados obtidos na avaliação do processo de biopurga com a amostra de concentrado do fungo selvagem *A. oryzae*, são promissores, visto que as enzimas comerciais, Viscozyme[®] L e Quimilase[®] HPS, são produzidas por microorganismos modificados geneticamente com o objetivo de produzir enzimas em maior concentração e com características apropriadas ao processo.

O uso do complexo enzimático contendo xilanase, β -glicosidases e 1,4- β -endoglucanase produzido pelo fungo *A. oryzae* NRRL 3485 em estado sólido no processo de biopurga quando crescido em resíduos da indústria do algodão foi avaliado por Csiszár e colaboradores (2007). Após o tratamento enzimático do tecido de algodão, o complexo enzimático mostrou-se eficiente na eliminação dos fragmentos do tegumento das fibras.

Embora a purga alcalina seja muito eficaz na remoção de impurezas, o processo não é seletivo, requer grandes quantidades de água para a lavagem uma vez que a etapa está concluída, tem uma alta exigência de energia e produz resíduos que são prejudiciais para o meio ambiente (HOONDAL et al., 2002; NIELSEN et al., 2009).

A viabilidade da biopurga tem sido reconhecida em muitas pesquisas ao longo de várias décadas, mas ainda existem vários problemas a serem resolvidos como longos períodos de incubação, ação enzimática não uniforme, tingimento irregular, baixa velocidade do processo e altas concentrações enzimáticas (HARTZELL; HSIEH, 1998; LIN; HSIEH, 2001; AGRAWAL; NIERSTRASZ; WARMOESKERKEN, 2008). Além disso, para a aplicação das enzimas na indústria têxtil devem ser considerados, não só as condições ótimas da enzima, mas sim o total do processo já que há muitos fatores ao longo da cadeia produtiva que podem afetar a atividade enzimática. No caso da biopurga, o pH do tratamento, a temperatura e o tempo do

processo são os fatores mais importantes a serem avaliados (KIM et al., 2007; WANG et al., 2007).

5. Conclusões

A aplicação do coquetel multienzimáticos produzido pelo fungo *A. oryzae* crescido em meio líquido, contendo casca de maracujá como fonte carbono, no processo de biopurga na indústria têxtil apresentou resultados promissores com potencial para substituir o processo de purga alcalina, processo prejudicial às fibras de algodão e ao meio ambiente.

Referências bibliográficas

AATCC. AATCC - Technical Manual Volume 27. ,1977. Research Triangle Park, NC: American Association of Textile Chemists and Colorists.

ABDEL-HALIM, E. S.; FAHMY, H. M.; FOUUDA, M. M. G. Bioscouring of linen fabric in comparison with conventional chemical treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 3, p. 707–711, 2008.

AGRAWAL, P. B. **The performance of cutinase and pectinase in cotton scouring**, 2005. University of Twente.

AGRAWAL, P. B.; NIERSTRASZ, V. A.; WARMOESKERKEN, M. M. C. G. Role of mechanical action in low-temperature cotton scouring with *F. solani pisi* cutinase and pectate lyase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 473–482, 2008.

AHLAWAT, S.; DHIMAN, S. S.; BATTAN, B.; MANDHAN, R. P.; SHARMA, J. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 521–526, 2009.

ANDREAUS, J.; CAVACO-PAULO, A. Enzimas no Processamento de Fibras Têxteis. In: E. P. S. Bon; M. A. Ferrara; M. L. Corvo (Eds.); **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. p.179–204, 2008. Rio de Janeiro: Interciência.

BUSCHLE-DILLER, G.; MOGAHZY, Y. EL; INGLESBY, M. K.; ZERONIAN, S. H. Effects of Scouring with Enzymes, Organic Solvents, and Caustic Soda on the Properties of Hydrogen Peroxide Bleached Cotton Yarn. **Textile Research Journal**, v. 68, n. 12, p. 920–929, 1998.

CSISZÁR, E.; SZAKÁCS, G.; KOCZKA, B. Biopreparation of cotton fabric with enzymes produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 7, p. 1765–1771, 2007.

CUI, L.; WANG, P.; WANG, Q.; FAN, X. The bioscouring efficiency and activity of alkaline pectinase for cotton fabric. **Fibers and Polymers**, v. 10, n. 4, p. 476–480, 2009.

FERREIRA, F. C. S. **Avaliação dos efeitos da aplicação da enzima celulase nas propriedades de substratos têxteis de algodão**, 2012.

HARDIN, I. R.; LI, Y.; AKIN, D. Cotton Wall Structure and Enzymatic Treatments. In: K.-E. L. Eriksson; A. Cavaco-Paulo (Eds.); **Enzyme applications in fiber processing**. 687th ed., v. 687, 1998.

HARDIN, I. R.; LI, Y.; AKIN, D. Enzyme Applications in Fiber Processing. In: A. Cavaco-Paulo; K.-E. Eriksson (Eds.); **ACS Symposium Series**. p.190–203, 1998. Oxford University Press.

HARTZELL, M. M.; HSIEH, Y.-L. Enzymatic Scouring to Improve Cotton Fabric Wettability. **Textile Research Journal**, v. 68, n. 4, p. 233–241, 1998.

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P.; TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 409–18, 2002.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228–240, 2013. Elsevier Ltd.

KARAPINAR, E.; SARIISIK, M. O. Scouring of cotton with cellulases, pectinases and proteases. **Fibers and Textiles**, v. 12, n. 3, p. 79–82, 2004.

KIM, J.; CHOE, E. K.; LEE, H. K.; JEONG, S. H.; SHIN, H. Transition of pectinases activity throughout the bio-scouring. 5th international conference on textile biotechnology. **Anais...**, 2007. Wuxi, China.

KLUG-SANTNER, B. G.; SCHNITZHOFER, W.; VRSANSKÁ, M.; et al. Purification and characterization of a new bioscouring pectate lyase from *Bacillus pumilus* BK2. **Journal of biotechnology**, v. 121, n. 3, p. 390–401, 2006.

KUBELKA, P. Errata: New Contributions to the Optics of Intensely Light-Scattering Materials Part I. **Journal of the Optical Society of America**, v. 38, n. 12, p. 1067, 1948.

LI, Y.; HARDIN, I. R. Enzymatic scouring of cotton: Effects on structure and Properties. **Textile Chemist and colorist**, v. 29, n. 8, p. 71–76, 1997.

LI, Y.; HARDIN, I. R. Enzymatic scouring of cotton: surfactants, agitation, and selection of enzymes. **Textile chemist and colorist**, v. 30, n. 9, p. 23–29, 1998. American Association of Textile Chemists and Colorists.

LIN, C.-H.; HSIEH, Y.-L. Direct Scouring of Greige Cotton Fabrics with Proteases. **Textile Research Journal**, v. 71, n. 5, p. 425–434, 2001.

LOSONCZI, A.; CSISZÁR, E.; SZAKÁCS, G.; BEZÚR, L. Role of the EDTA Chelating Agent in Bioscouring of Cotton. **Textile Research Journal**, v. 75, n. 5, p. 411–417, 2005.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, N.; SILVA, R. DO N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9–23, 2009.

MOROZOVA, V. V; SEMENOVA, M. V; SALANOVICH, T. N.; et al. Application of Neutral–Alkaline Pectate Lyases to Cotton Fabric Boil off. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 686–691, 2006.

MOURA, C. L. A. DE. **Maceração enzimática da polpa de cajá (Spondias mombin L.)**, 2009. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ.

NIAZ, A.; MALIK, Q. J.; MUHAMMAD, S.; SHAMIM, T.; ASGHAR, S. Bioscouring of cellulosic textiles. **Coloration Technology**, v. 127, n. 4, p. 211–216, 2011.

NIELSEN, P. H.; KUILDERD, H.; ZHOU, W.; X. LU. Enzyme biotechnology for sustainable textiles. In: R. S. Blackburn (Ed.); **Sustainable Textil - Life cycle and environmental impact**. primeira ed., 2009. New Delhi, India: Woodhead Publishing Limited.

NOVOZYME. Viscozyme L. **Novozymes**, 2010.

OUAJAI, S.; SHANKS, R. A. Morphology and structure of hemp fibre after bioscouring. **Macromolecular bioscience**, v. 5, n. 2, p. 124–34, 2005.

SHORE, J. **Cellulosics dyeing**. United Kingdom: Society of Dyers and Colourists, 1995.

TRAORE, M. K.; BUSCHLE-DILLER, G. Environmentally friendly scouring processes. **Book of Papers, National Technical Conference of AATCC**. p.183 – 189, 1999.

TZANOV, T.; CALAFELL, M.; GUEBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. Bio-preparation of cotton fabrics. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 6-7, p. 357–362, 2001.

VIGNESWARANB, C.; ANBUMANI, N.; ANANTHASUBRAMANIAN, M. Biovision in Textile Wet Processing Industry- Technological Challenges. **Journal of Textile and Apparel Technology and Management**, v. 7, n. 1, 2011.

WANG, Q.; FAN, X.; HUA, Z.; CHEN, J. Optimizing bioscouring condition of cotton knitted fabrics with an alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* WSHB04-02 by using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 107–113, 2007.

ZHANG, Y.; CHEN, S.; HE, M.; et al. Effects of *Thermobifida fusca* cutinase-carbohydrate-binding. Module fusion proteins on cotton bioscouring. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 4, p. 645–653, 2011.

CAPITULO 4

EXTRAÇÃO LIQUIDO-LIQUIDO DE PECTINASES PRODUZIDAS PELO FUNGO *Aspergillus oryzae* USANDO O SISTEMA MICELAR DE DUAS FASES AQUOSAS - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA *SEPARATION AND PURIFICATION TECHNOLOGY* (2013)

Resumo

Pectinases produzidas pelo fungo *A. oryzae* crescido em meio líquido contendo casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono foram extraídas utilizando um sistema micelar de duas fases aquosas contendo tampão fosfato de sódio/Triton[®] X-114. A condição mais adequada para esta extração foi avaliada em um desenho fatorial experimental 2³ com três repetições no ponto central. A variável analisada foi a atividade pectinolítica a qual variou desde 0,233 a 0,601 UI/mL. A maior atividade foi obtida na fase pobre em micelas nas condições de 25°C, 8% (p/p) de Triton[®] X-114 e 20% (p/p) do concentrado. Os resultados indicam que este sistema micelar de duas fases aquosas (SMDFA) foi capaz de remover pigmentos visíveis e possíveis inibidores de pectinase presentes no caldo de fermentação, ficando retidos na fase rica em micelas. Portanto, este sistema pode ser explorado como um primeiro passo na purificação de pectinases a partir de um sistema de produção de baixo custo, com potencial aplicação industrial.

Palavras chaves: *A. oryzae*; Pectinase; Triton[®] X-114; sistema micelar de duas fases aquosas, casca de maracujá-amarelo.

Abstract

Production of pectinase by the *A. oryzae* fungus grown in liquid medium containing yellow passion peel fruit like a carbon source were extracted by a micellar system of sodium phosphate buffer/Triton® X- 114. The most appropriate condition for this extraction was evaluated in an experimental factorial design 23 and three repetitions at the central point. The variable analyzed was pectinolytic activity with values between 0.233 and 0.601 IU/mL. The highest activity was obtained with the micelles poor phase under conditions of 25°C, 8% (wt/wt) Triton® X-114 and 20% (wt/wt) of the concentrate. The results indicated that this aqueous two-phase micellar system (ATPMS) was able to remove visible pigments and possible pectinase inhibitors presents in fermented broth, this compounds were captured in the micelas rich phases. Therefore, this system can be exploited like a first step in pectinase purification from a low cost production system with potential industrial application.

Keywords: *A. oryzae*; Pectinase; Triton® X-114; aqueous two-phase micellar system (ATPMS), yellow passion fruit peel.

1. Introdução

O Brasil é o maior produtor e consumidor de maracujá do mundo, gerando com isto grandes quantidades de resíduos (IBGE, 2012). O rendimento da fruta, em média, é de 14,8 g de pectina por 100 g de casca, aproximadamente (KULKARNI; VIJAYANAND, 2010). Isto faz deste resíduo uma fonte de carbono ideal para o crescimento de fungos e para a produção de várias enzimas, incluindo as pectinases. Estas enzimas são secretadas no meio extracelular para degradar macromoléculas, como a pectina, a moléculas de menor tamanho para serem assimiladas e utilizadas em diversas reações bioquímicas.

As pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pectinas, presentes na maioria das plantas, e são hoje umas das principais enzimas aplicadas na indústria alimentícia, principalmente na clarificação de sucos, na culinária asiática, entre outras (UENOJO et al., 2007). Os processos de purificação das enzimas são os responsáveis por cerca de 70% do custo final do produto. Na maioria dos casos, uma enzima de alta pureza não é necessária em processos industriais permitindo assim o uso de técnicas de separação não-cromatográficas. O sistema micelar de duas fases aquosas (SMDFA) se encaixa neste perfil de purificação (MAZZOLA et al., 2008).

As micelas são agregados de moléculas de surfactante. Uma molécula de surfactante é formada por duas partes quimicamente distintas: uma parte hidrofílica e um resíduo hidrofóbico. As micelas tradicionais são formadas de tal maneira que as porções hidrofóbicas das moléculas de surfactante migram para dentro, a fim de minimizar o contato com a água, formando o núcleo micelar enquanto as porções hidrofílicas permanecem na periferia para maximizar o seu contato com o ambiente aquoso. A formação de micelas reflete um balanço complexo de várias forças intermoleculares, incluindo forças de van der Waals, atrações eletrostáticas e interações hidrofóbicas (TANFORD, 1980). As microestruturas das micelas formadas pela ligação não covalente de moléculas de surfactante individuais são instáveis, contrariamente aos polímeros, por exemplo, que são formados pela ligação covalente de monômeros individuais. Conseqüentemente, a forma da micela e o

tamanho, bem como as propriedades das soluções micelares associadas, podem ser ajustados *in situ* pela variação das condições da solução, tais como a concentração do surfactante, temperatura e tipo e concentração do sal (LIU et al., 1998). No SMDFA, sob condições apropriadas, duas fases aquosas se separam espontaneamente, tornando-se as fases líquidas imiscíveis, uma das quais tem uma maior concentração de micelas do que a outra. A temperatura é um dos fatores determinantes para a separação dos surfactantes não-iônicos que têm grupos de óxido de etileno, como parte hidrofílica. Em temperaturas mais elevadas, acima da concentração micelar crítica (CMC), a solução aquosa de Triton[®] X-114 se separa em duas fases macroscópicas observáveis: uma rica em micelas (fase inferior) e outra fase oposta, pobre em micelas (fase superior) (ALRED et al., 1994; MAGALHÃES et al., 2007).

A CMC, ou seja, a concentração mínima de tensoativo presente em solução necessária para a formação de micela é considerada condição importante para a separação das fases, em sistemas contendo concentração de tensoativo abaixo da CMC, o tensoativo fica disperso e não formam micelas. Acima desta concentração, a substância tende a formar micelas que podem estar presentes em ambas as fases (LIU et al., 1996). A fase rica em micelas, no entanto, contém maior número de micelas do que na fase pobre (NIKAS et al., 1992). Este ambiente único, com grandes diferenças físicas entre as fases ricas e pobres em micelas, é a base de um processo de separação efetivo. Desta forma, o SMDFA tem potencial como uma separação adequada e útil como método de purificação e concentração de biomateriais (LIU et al., 1996).

A inibição de enzimas por compostos fenólicos é relatada na literatura (BELL et al., 1965; XIMENES et al., 2010), o que justifica a sua remoção para uma futura aplicação industrial. A este respeito, a extração líquido-líquido atende o interesse industrial, através da clarificação do meio de cultura, com a separação do composto fenólico, sendo considerada como uma técnica simples e de baixo custo.

Várias biomoléculas já foram extraídas e purificadas pelo SMDFA tais como proteínas em laboratório (LINDER et al., 2004; LAM et al., 2005; ROOSMALEN, VAN

et al., 2006) ou em grande escala (MINUTH et al., 1996; SELBER et al., 2004), ácidos nucleicos (DIAS et al., 2000), vírus (KAMEI; KING; et al., 2002) e antibióticos (LEE; SU, 1999).

2. Objetivo

Clarificar o concentrado obtido a partir do crescimento do fungo *A. oryzae* em meio líquido contendo casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono, utilizando um sistema micelar de duas fases aquosas formado por tampão fosfato de sódio/Triton X-114.

3. Material e métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília sob a orientação da Professora Dra. Pérola Magalhães.

3.1. Origem dos reagentes

O surfactante octilfenoxi polietoxietanol não iônico (Triton[®] X-114) foi adquirido pela Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, USA) e o kit *BCA[™] Protein Assays* foi adquirido pela Pierce (Pierce, Rockford, IL, USA).

3.2. Cultivo em meio submerso

O cultivo do fungo *A. oryzae* em casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono em meio submerso foi realizado por dez dias a 28°C e 120 rpm conforme item 3.5 do capítulo 2.

3.3. Ultrafiltração

O extrato bruto obtido após cultivo foi concentrado pelo processo de ultrafiltração conforme descrito no item 3.10 do capítulo 2.

3.4. Determinação da atividade enzimática e proteína total

A concentração de proteína total foi determinada utilizando o kit *BCA™ Protein Assays* (Pierce), segundo instruções próprias do fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.). Uma solução de BSA (0,1 mg/mL) foi usada para construção da curva padrão de acordo com instruções do fabricante.

A atividade pectinolítica do concentrado foi quantificada como descrita no item 3.6 do capítulo 2.

3.5. Mapeamento da curva de coexistência do sistema tampão fosfato de sódio/Triton® X-114

O diagrama de fase do surfactante não iônico Triton® X-114 em tampão fosfato de sódio foi obtido pelo método de ponto-de-névoa (MEEREN, VAN DER et al., 2002). As soluções de surfactantes tamponadas de concentrações conhecidas foram preparadas e colocadas em um banho-maria termoregulado transparente com controle de temperatura de 0,02°C. A temperatura foi inicialmente reduzida de tal modo que a solução apresentou uma fase única e límpida. Em seguida, a temperatura foi aumentada lentamente. A temperatura à qual a solução tornou-se turva, indicando o início da separação de fases, foi determinada como a temperatura de ponto-de-névoa. O procedimento foi realizado em triplicata para todos os pontos.

3.6. Planejamento experimental

Para a purificação da pectinase utilizando o SMDFA foi estabelecido um planejamento fatorial 2³, com ponto central com 3 repetições, sendo consideradas as

variáveis temperatura (T), volume de Triton[®] X-114 (X) e volume do concentrado (C), totalizando 11 ensaios.

Os níveis superior e inferior dos fatores estudados foram, respectivamente, temperatura (T) 25° e 35°C, volume de Triton[®] X-114 (X) 4 e 8 mL e volume do concentrado (C) 10 e 20 mL. Os valores do ponto central para T, X e C foram, respectivamente, 30°C, 6 mL e 15 mL (Tabela 14).

Tabela 14. Matriz do planejamento fatorial 2^3 com ponto central em triplicata para a extração de pectinase utilizando SMDFA (T: Temperatura; X: Triton X-114; C: Concentrado).

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	X1	X2	X3	T (°C)	X (mL)	C (mL)
1	-1	-1	-1	25	4	10
2	+1	-1	-1	35	4	10
3	-1	+1	-1	25	8	10
4	+1	+1	-1	35	8	10
5	-1	-1	+1	25	4	20
6	+1	-1	+1	35	4	20
7	-1	+1	+1	25	8	20
8	+1	+1	+1	35	8	20
9	0	0	0	30	6	15
10	0	0	0	30	6	15
11	0	0	0	30	6	15

3.7. Delineamento experimental

A avaliação da extração de pectinase utilizando SMDFA foi por meio de análise de variância, a um nível de significância $p \leq 0,05$ e a extensão da variância explicada por cada modelo foi dada pelo coeficiente de determinação, R^2 . Foi realizado o desenho fatorial 2^3 com três repetições no ponto central. Utilizou-se, ainda, o planejamento fatorial fracionado em dois níveis, onde cada fator assume um

valor máximo e um mínimo. Os resultados estatísticos foram tratados utilizando o software Design Expert[®], versão 8,02 (Wiley).

3.8. Clarificação do concentrado com Triton[®] X-114

Sistemas tamponados, cada um com uma massa total de 3,0 g, foram preparados em tubos de ensaio de vidro graduados (10 mL). Triton[®] X-114 em diferentes concentrações (%p/p) (X) foi misturado com o tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e com concentrações crescentes do concentrado (%p/p) (C) (Tabela 13). A solução resultante foi homogeneizada, evitando a formação de espuma. Posteriormente, as soluções foram colocadas em um banho-maria termoregulado transparente com controle de temperatura de 0,02°C a diferentes temperaturas, definidas anteriormente (Tabela 13). As soluções foram mantidas por 2 horas para atingir o equilíbrio de separação. Depois disso, as duas fases micelares coexistentes formadas foram cuidadosamente retiradas e armazenadas, separadamente. A atividade enzimática das duas frações foi determinada conforme item 3.6 do capítulo 2. O procedimento foi repetido três vezes para assegurar a reprodutibilidade.

O comportamento da partição das enzimas no SMDFA foi quantificado em termos do coeficiente de partição (K), definido da seguinte maneira:

$$K = \frac{C_c}{C_d}$$

Onde C_c e C_d correspondem à atividade enzimática do concentrado na fase rica e pobre de micelas, respectivamente. O balanço de massa (BM) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$BM = \frac{C_c V_c + C_d V_d}{C_i}$$

Onde C_c , C_d , e C_i correspondem às concentrações do concentrado na fase rica e pobre em micelas e à concentração inicial do concentrado, respectivamente. V_c , V_d , e V_i são os volumes da fase rica e pobre em micelas e do concentrado adicionado

ao sistema, respectivamente. O comportamento da partição da enzima também foi avaliado com base na recuperação da pectinase (Y) em cada fase particionada para cada sistema estudado:

$$Y = \frac{C_d V_d}{C_i V_i} \times 100$$

4. Resultados e discussão

A maior atividade pectinolítica do fungo *A. oryzae* quando cultivado em meio líquido contendo casca de maracujá-amarelo como fonte de carbono foi observado no décimo dia de cultivo. A casca de maracujá é um resíduo agroindustrial rico em pectina, niacina, ferro, cálcio e fósforo (OLIVEIRA et al., 2002). O processo de ultrafiltração utilizado para concentrar a amostra deu como resultado um produto com atividade enzimática igual a 0,805 UI/mL. Este valor para a atividade da enzima pectinase é próximo ao relatado na literatura para outros fungos filamentosos (SIQUEIRA et al., 2010). No entanto, a degradação enzimática da casca de maracujá libera diferentes pigmentos coloridos no meio fermentado, como compostos fenólicos, carotenóides e flavonóides. Vários estudos indicam a presença na casca de maracujá de polifenóis (OLIVEIRA et al., 2002), ácidos graxos poli-insaturados (KOBORI; JORGE, 2005), de fibra (CÓRDOVA et al., 2005), carotenóides (LÓPEZ-VARGAS et al., 2013) e flavonóides (TALCOTT et al., 2003), entre outras substâncias, os quais podem ser precursores de compostos fenólicos podendo gerar uma cor escura após a degradação microbiana e uma possível inibição enzimática.

A influência do concentrado na curva binodal foi avaliada determinando que a maior concentração do concentrado, menores são os valores do “ponto-de-névoa” em comparação com a curva na ausência deste (Figura 32).

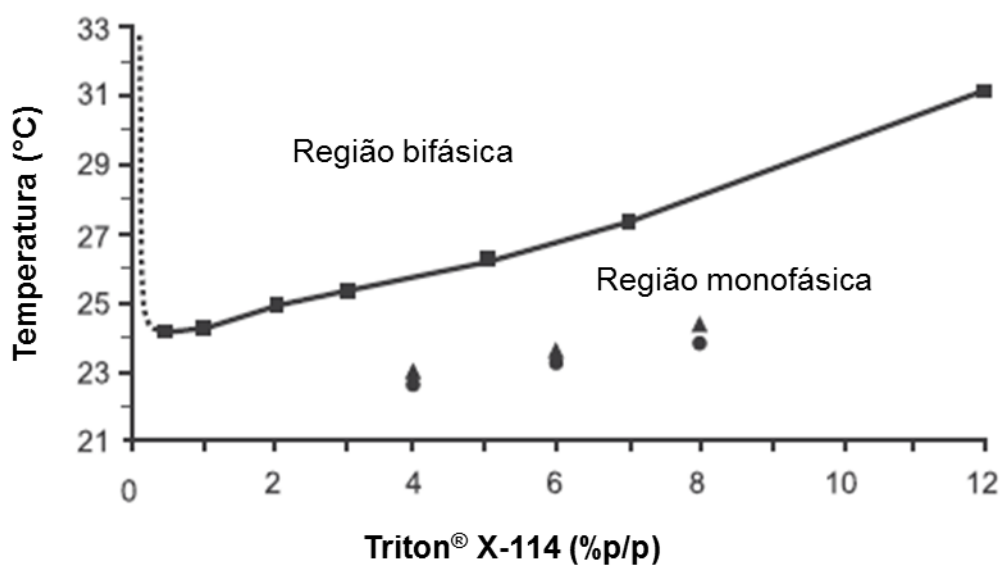


Figura 32. Diagrama de fases do sistema micelar tampão fosfato de sódio/Triton® X-114 mostrando as regiões monofásicas e bifásicas (LOPES et al., 2011). ▲ representa o “ponto-de-névoa” do sistema de 10% (p/p) do concentrado (4% de Triton 23 +/- 0,15°C; 6% de Triton 23,6 +/- 0,12°C; 8% de Triton 24,3 +/- 0°C). ● representa o “ponto-de-névoa” do sistema 20% (p/p) do concentrado (4% de Triton 22,6 +/- 0,06°C; 6% de Triton 23,2 +/- 0,12°C; 8% de Triton 23,9 +/- 0,06°C).

Um planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central foi utilizado para aperfeiçoar a clarificação do concentrado pelo sistema micelar tampão fosfato de sódio/Triton® X-114. Os valores da temperatura, da concentração do concentrado e do Triton® X-114 foram escolhidos com base na curva bimodal na presença do concentrado (Tabela 15).

Tabela 15. Valores das variáveis do planejamento fatorial 2^3 com três repetições no ponto central utilizado para avaliar a influência da temperatura, Triton® X-114 e concentrações do concentrado na clarificação pelo SMDFA.

Variáveis	-1	0	+1
Temperatura (°C)	25	30	35
Triton® X 114 (%p/p)	4	6	8
Concentrado (%p/p)	10	15	20

Os resultados experimentais obtidos encontram-se resumidos na Tabela 16. O rendimento foi calculado com base na atividade pectinolítica. Resultados de rendimento superiores a 100% foram detectados em todos os ensaios. Isso sugere que proteínas, compostos fenólicos e carotenóides poderiam estar inibindo a atividade enzimática no concentrado e a separação destas moléculas para a fase rica em micelas possibilitou uma melhora na atividade da enzima presentes separadamente na fase pobre em micelas.

Tabela 16. Matriz do planejamento fatorial 2^3 com ponto central em triplicata para a clarificação do concentrado utilizando SMDFA (tampão fosfato de sódio/Triton[®] X-114) (T: Temperatura; X: Triton[®] X-114; C: Concentrado; Y: recuperação da pectinase).

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis reais			Variável resposta	
	X1	X2	X3	T (°C)	X (%)	C (%)	UI/mL	Y (%)
1	-1	-1	-1	25	4	10	0,453	174,10
2	+1	-1	-1	35	4	10	0,233	192,40
3	-1	+1	-1	25	8	10	0,391	194,70
4	+1	+1	-1	35	8	10	0,316	216,40
5	-1	-1	+1	25	4	20	0,557	241,00
6	+1	-1	+1	35	4	20	0,439	218,40
7	-1	+1	+1	25	8	20	0,601	261,60
8	+1	+1	+1	35	8	20	0,468	193,90
9	0	0	0	30	6	15	0,410	375,50
10	0	0	0	30	6	15	0,470	242,10
11	0	0	0	30	6	15	0,490	226,70

Na literatura vários trabalhos apresentaram rendimento superior a 100% para a extração de enzimas usando o SMDFA (MAYERHOFF et al., 2004; CAVALCANTI et al., 2006). Cavalcanti e colaboradores (2006) em estudos da extração de

fosfolipase C utilizando o SMDFA com o sistema PEG/fosfato obtiveram um rendimento de 230%.

O maior rendimento (375,5 %) foi obtido na fase pobre em micelas do ensaio número 9 (Tabela 16) (30°C; 6% (p/p) de Triton[®] X-114; 15% (p/p) de concentrado). Por outro lado, a maior atividade enzimática foi observada na fase pobre em micelas do ensaio número 7 (Tabela 16) (25°C; 8% (p/p) de Triton[®] X-114; 20% (p/p) de concentrado).

A atividade de pectinase (UI//mL) foi a variável dependente escolhida, uma vez que com isso, pode-se reduzir o erro relacionado com a inibição enzimática que provavelmente ocorre no concentrado. Ensaio enzimáticos com a fase rica em micelas não foram considerados precisos, devido à interferência do surfactante com o ensaio enzimático empregado. No entanto, os valores de K mais baixos que um, em todos os sistemas micelares, indicam a partição das pectinases preferencialmente na fase pobre em micelas, devido às forças de repulsão entre a enzima e as micelas.

Além disso, a amostra resultante após o sistema de micelas selecionado, tampão fosfato de sódio/Triton[®] X-114, apresenta uma importante redução no valor da absorvância no comprimento de onda maior que 400 nm devido à remoção de pigmentos visíveis presentes no concentrado, tais como os carotenoides que absorvem luz entre 425 nm e 490 nm (AZEVEDO-MELEIRO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; LÓPEZ-VARGAS et al., 2013) ou flavonoides os quais apresentem duas bandas de absorção entre 300 - 550 nm e entre 240 - 490 nm (MERKEN; BEECHER, 2000). Este resultado sugeriu a separação dos pigmentos para a fase rica em micelas. A retenção dos contaminantes para a fase inferior, rica em micelas, provavelmente se deu devido ao caráter hidrofóbico destas substâncias (RANGEL-YAGUI et al., 2004). Bordier (1981) demonstrou que as proteínas hidrofílicas particionam preferencialmente na fase pobre de micelas, enquanto que as proteínas hidrofóbicas de membrana ficam na fase rica em micelas. O SMDFA pode ser também utilizado para a extração de componentes úteis de origem vegetal e na extração de corantes naturais (RAGHAVARAO et al., 2003).

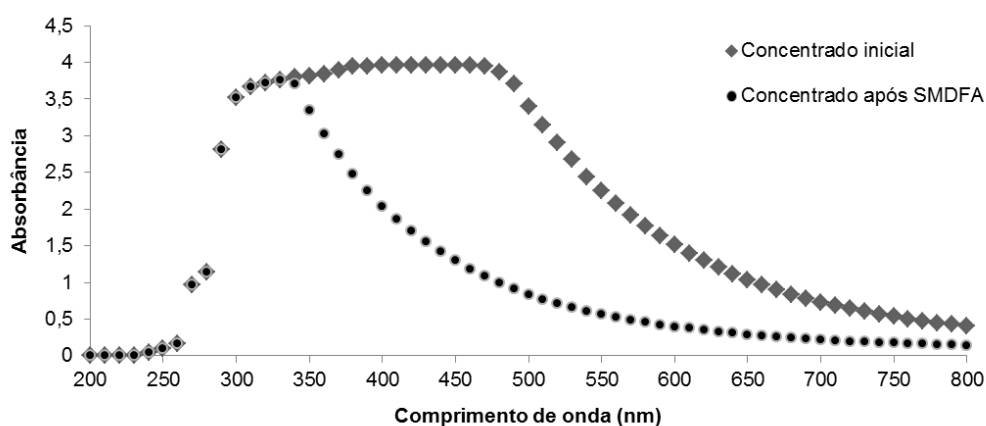


Figura 33. Avaliação dos pigmentos coloridos visíveis presentes na fase micelar pobre em micelas (fase topo) do SMDFA com a adição do concentrado.

Além disso, a diferença entre os valores de absorvância do concentrado após o SMDFA também pode estar relacionada com a teoria do volume de exclusão (V_{ex}). De acordo com esta teoria, o particionamento das proteínas é governado principalmente por interações repulsivas estéricas entre as interações das proteínas globulares hidrofílicas e as micelas não-carregadas. Neste caso, as proteínas se particionam preferivelmente na fase pobre em micelas, onde elas experimentam menos interações com o volume das micelas (KAMEI; KING; et al., 2002).

A Tabela 17 mostra a análise de variância (ANOVA), incluindo os fatores significativos para a purificação parcial de pectinase pelo SMDFA tampão fosfato de sódio/Triton[®] X-114. A temperatura (X1) e o concentrado (X3), em diferentes concentrações (%p/p), exerceram efeitos significativos sobre a clarificação do concentrado ($p \leq 0,05$). A análise de variância revelou que o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9548$) e o coeficiente de determinação ajustado (ajustado $R^2 = 0,84934$) foram altos. A adequação do modelo também é verificada pelo valor obtido pelo R^2 ajustado. Valores acima de 75% indicam que os fatores no experimento explicam a grande porcentagem de variação observada. Neste caso, o R^2 ajustado foi igual a 84,93%. Se o modelo representa de forma adequada o fenômeno, a falta de teste de ajuste não deve ser significativa ($p > 0,05$) (CALADO; MONTGOMERY, 2003). O valor obtido de p para a falta de teste de ajuste foi $p = 0,477659$ (não significativa), o que indica que o modelo é apropriado para este estudo.

Tabela 17. Análise de variância (ANOVA) para a clarificação do concentrado avaliando a atividade enzimática na fase superior como variável de resposta. O modelo de segunda ordem incluindo às variáveis independentes: temperatura (X_1), concentração de Triton[®] X-114 (X_2) e concentração do concentrado (X_3).

Fonte	SQ	GL	MQ	F-value	p-value
Temperatura (X_1)	0,037265	1	0,037265	21,49875	0,043502*
Triton[®] X-114 (%p/p) (X_2)	0,001105	1	0,001105	0,63721	0,508448
Concentrado (%p/p) (X_3)	0,056448	1	0,056448	32,56615	0,029361*
1 por 2	0,002112	1	0,002112	1,21875	0,384662
1 por 3	0,000242	1	0,000242	0,13962	0,744554
2 por 3	0,000338	1	0,000338	0,19500	0,701943
1*2*3	0,003200	1	0,003200	1,84615	0,307180
Falta de ajuste	0,001301	1	0,001301	0,75043	0,477659
Erro puro	0,003467	2	0,001733		
Total SQ	0,105477	10			

SQ = soma dos quadrados; GL = graus de liberdade; MQ = meia do quadrado; $R^2 = 0.9548$. *Nível de significância de 95%

Os resultados da ANOVA para ambas as respostas estão ilustrados no gráfico de Pareto (Figura 34) omitindo as interações menos significativas. Neste gráfico, o comprimento de cada barra é proporcional ao efeito padronizado da variável ou relacionado com a interação, e as barras que se estendem além da linha vertical corresponde aos efeitos estatisticamente significativos a um nível de confiança de 95%. De acordo com a análise, o aumento da concentração do concentrado (sinal positivo) provoca aumento na atividade enzimática de pectinase na fase superior, enquanto aumento da temperatura (sinal negativo) provoca uma diminuição. A concentração de Triton[®] X-114 não foi significativa no modelo testado. No entanto, a possibilidade de influência do Triton-X114 em outras condições não testadas não pode ser excluída.

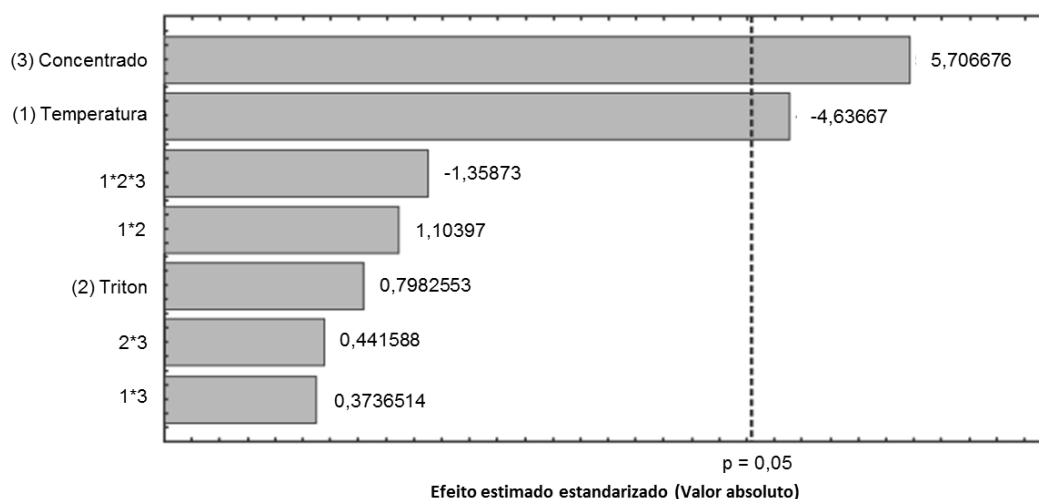


Figura 34. Gráfico de Pareto para os efeitos das variáveis temperatura (X_1), concentração de Triton[®] X-114 (X_2) e concentração do concentrado (X_3) em UI/ML na fase pobre em micelas na clarificação do concentrado pelo SMDFA.

O modelo matemático para representar o processo de extração de pectinase utilizando SMDFA tampão fosfato de sódio/Triton[®] X-114 considerando as variáveis significativas é descrito pela equação:

$$Y_{topo} = 0,58975 - 0,01365 * X_1 - 0,01680 * X_3$$

Onde Y representa o valor da atividade enzimática (UI/mL) na fase superior, X_1 representa a temperatura e X_3 representa a concentração do concentrado. Essa equação mostra que o melhor resultado é encontrado em menor temperatura e maior concentração do concentrado. Assim, para aplicações futuras, os experimentos devem ser testados em condições próximas ao indicado neste trabalho.

A Figura 35 ilustra de forma simplificada a clarificação do concentrado pelo sistema micelar de duas fases aquosas (SMDFA).

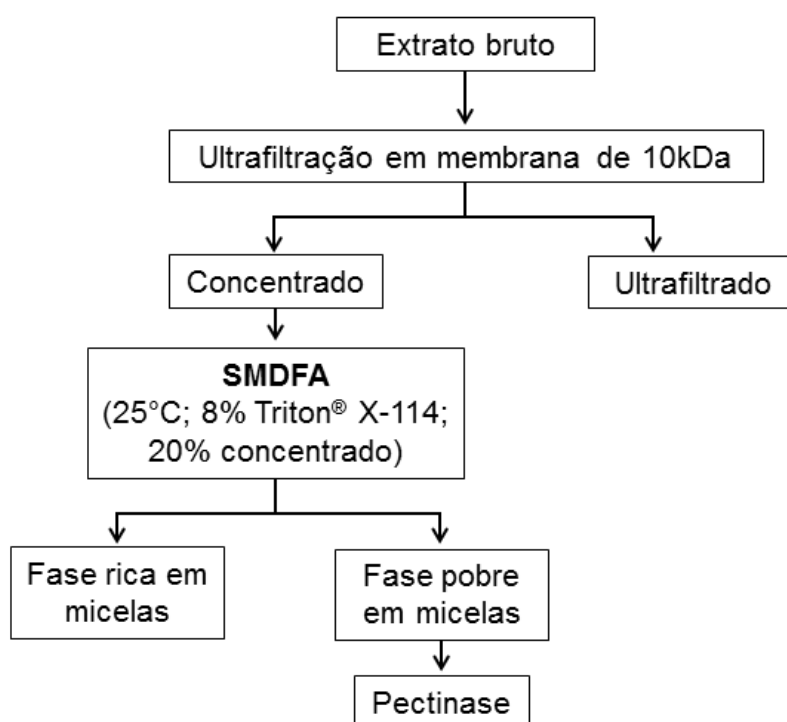


Figura 35. Esquema da clarificação do concentrado com a extração de compostos presentes no meio de cultivo pelo sistema micelar de duas fases aquosas (SMDFA).

Este trabalho foi descrito como um sistema viável para a aplicação industrial de pectinases, usando um meio de cultura de baixo custo, melhorando a composição e as características físicas do concentrado com a enzima de interesse sem perda da atividade enzimática. Para produtos que exigem elevado grau de pureza, a extração no SMDFA não é suficiente e, nesses casos, o processo deve ser sucedido por uma ou mais etapas cromatográficas (FRANCO et al., 2008).

5. Conclusões

A efetiva clarificação do concentrado contendo pectinases foi atingida usando um SMDFA simples formado por tampão fosfato de sódio/Triton® X-114. O método foi capaz de extrair os pigmentos para a fase rica em micelas e as pectinases foram recuperadas na fase pobre em micelas. Portanto, o SMDFA apresentado neste trabalho representa um passo importante para o desenvolvimento de um método de baixo custo para a clarificação do concentrado.



Contents lists available at ScienceDirect

Separation and Purification Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/seppur

Liquid–liquid extraction of pectinase produced by *Aspergillus oryzae* using aqueous two-phase micellar system



Paula M. Duque Jaramillo^a, Helder A. Rocha Gomes^a, Félix Gonçalves de Siqueira^b,
Mauricio Homem-de-Mello^c, Edivaldo Ximenes Ferreira Filho^a, Pérola O. Magalhães^{c,*}

^aLaboratory of Enzymology, Department of Cellular Biology, University of Brasília, CEP 70910-900 Brasília, DF, Brazil

^bLaboratory of Biochemical Processes (LPB), Embrapa Agroenergia, Brasília, DF, Brazil

^cDepartment of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, Campus Darcy Ribeiro, University of Brasília, CEP 70910-900 Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 June 2013

Received in revised form 20 September 2013

Accepted 21 September 2013

Available online 10 October 2013

Keywords:

Aspergillus oryzae

Pectinase

Triton X-114

Aqueous two-phase micellar system

Passion fruit peel

ABSTRACT

Separation and purification of proteins, organic compounds and other biomolecules are feasible by liquid–liquid extraction based on phase separation in aqueous micellar solution. This work aimed to optimize the extraction of the pectinase enzyme produced by *Aspergillus oryzae* in a passion fruit peel media, using a micellar Triton X-114/sodium phosphate buffer system. Best condition for this extraction was evaluated in a 2³ experimental factorial design with a centered face and three repetitions at the central point. The variable analyzed was the pectinase activity, and in this design, it varied from 0.233 to 0.601 U mL⁻¹. The highest activity was obtained in the top phase at conditions 25 °C, 8% Triton X-114 (wt/wt) and 20% concentrated crude extract (wt/wt). The results indicated that this aqueous two-phase micellar system (ATPMS) was able to remove visible pigments and possible pectinase inhibitors present in fermented broth, that partitioned in the bottom phase. Therefore, this system can be exploited as a first step in pectinase purification from a low cost production system with potential industrial application.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Brazil is the largest passion fruit producer in the world, generating large amounts of waste from its rind, discharged in juice and other derivative products [1]. Agro-industrial residues, including passion fruit peel, represent an important alternative source for the microbial growth and production of industrial enzymes. In addition, they contain lignocellulosic material available for exploitation as sources of chemical feedstocks, fuels, foods and feeds. This fruit yields, on average, about 14.8 g of pectin per 100 g of peel [2], and can be used as a source of carbon for the growth of fungi and in the production of various enzymes, including pectinases. This enzyme is released to the extracellular medium by fungus to breakdown the pectin polysaccharide complex in simple sugars to be assimilated and used in several biochemical reactions.

Pectinase is a class of hydrolytic enzymes mainly applied in food industry, as in juice clarification and fermentation of Asiatic food [3]. There are other applications for this class of enzymes as bioscouring agent in the textile industry [4].

Enzyme purification is responsible for about 70% of the final cost of the product in industrial processes. In most cases, a high purity enzyme is not necessary in industrial processes, supporting non-chromatographic separation techniques. Aqueous Two-Phase Micellar Systems (ATPMS) fit in this purification profile [5].

Micelles are self-assembling aggregates composed of surfactant molecules. A surfactant molecule consists of two distinct chemical moieties: the hydrophilic, water-loving moiety and the hydrophobic, water-fearing moiety. Micelles are formed in such a manner that the hydrophobic moieties of surfactant molecules flock inside to form the micellar core in order to minimize the unfavorable contact with water, while the hydrophilic moieties remain on the periphery to maximize their contact with the aqueous environment. The formation of micelles represents a delicate balance of several intermolecular forces including those of the van der Waals, steric, hydrophobic, and electrostatic types [6]. The resulting micelles are labile microstructures formed by the noncovalent binding of individual surfactant molecules, contrary to polymers, for example, which are formed by the covalent binding of individual monomers. Consequently, micellar shape and size, as well as the associated micellar solution properties, can be tuned in situ by varying solution conditions, such as surfactant concentration, temperature, and salt type and concentration [6]. In ATPMS, under appropriate conditions, two aqueous phases spontaneously separates, becoming immiscible, liquid phases, one of which has a

* Corresponding author. Address: Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília, Brazil. Tel.: +55 61 33072589.

E-mail address: perolamagalhaes@unb.br (P.O. Magalhães).

greater concentration of micelles than the other [6]. Temperature is one of the determinant factors to phase separation among non-ionic surfactants that have ethylene oxide groups as its hydrophilic part. Upon higher temperatures, aqueous solutions of octylphenolethoxylate (Triton X-114) separate in two observable macroscopic phases. One of those micelle-rich (bottom phase), and another, opposite, micelle-poor phase (Fig. 1) [7–9].

Other important condition to phase separation is the critical micelle concentration, a threshold concentration below which there is no micelle formation and the surfactant is dispersed. Above this concentration, the substance tends to form micelles, which are present in both phases [10]. The micelle-rich phase, however, contains larger and outnumbered micelles than the diluted phase [11]. This unique environment, with high physicochemical contrast among micelle-rich and micelle-poor phases is the basis of an effective separation procedure. In this way, ATPMS has potential as a suitable and useful separation, purification and concentration method for biomaterials [10].

Several biomolecules have already been extracted and purified by ATPMS. Examples includes proteins in a laboratory [12–14] or large-scale [15,16], DNA and nucleic acids [17], viruses [18] and antibiotics [19].

In this paper, we report the successful preferential extraction/pre-purification of the pectinase produced by *Aspergillus oryzae*, with the simultaneous removal of the impurities present in the cultivate medium. In so doing, we present proof-of-principle of pectinase partitioning in aqueous two-phase micellar systems, with no activity loss, thereby establishing an attractive scalable method for the purification of this enzyme produced in passion fruit peel, product that can be considered an agricultural residue. Moreover, this work presents a viable product for the industrial application of pectinases, using a low-cost culture medium to obtain a clarified concentrated of the target enzyme. The filamentous fungus *A. oryzae* has the GRAS (Generally Recognized as Safe) status from FDA (Foods and Drugs Administration), for the production of several enzymes [20], thus allowing it to be used in animal and human feed.

2. Material and methods

2.1. Materials

The nonionic surfactant octylphenolethoxylate (Triton X-114) was purchased from Sigma (St. Louis, MO). Other chemicals were

of reagent grade and used as purchased unless otherwise stated. All the other reagents were of analytical grade.

2.2. Organism and enzyme production

A. oryzae was isolated from the natural composting of textile wastes and was identified by the Laboratory of Food Microbiology, Federal University of Lavras, Brazil. The fungus was maintained in PDA medium (2% potato broth, 2% dextrose and 2% agar). For pectinase production, an aliquot (5.0 mL) of spore suspension (10^8 spores/mL) was inoculated into Erlenmeyer flasks containing 500 mL of the liquid medium (0.7% KH_2PO_4 , 0.2% K_2HPO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.16% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ w/v) at pH 7.0 with 1% (w/v) passion fruit peel as the carbon source. The cultures were incubated at 28 °C under constant agitation at 120 rpm for ten days. The crude extract obtained from these cultures was centrifuged at 10,500g for 10 min at 20 °C, filtered through a Buchner funnel with filter paper (Whatman No. 1), and stored at 4 °C.

2.3. Mapping the coexistence curve of the Triton X-114/buffer systems

The phase diagram of the nonionic surfactant in buffer were obtained by the cloud-point method [21]. According to this theory and based on the already known coexistence curve at pH 7.2 [22], in this work the influence of the crude extract in the binodal curve was evaluated using three different surfactant concentrations (4.0, 6.0 and 8.0%wt/wt). Briefly, ATPMS were formed containing buffered surfactant solutions on the above concentrations and crude extract at 10% and 20% (%wt/wt). The systems were prepared and placed in a transparent thermo-regulated device with temperature control within 0.02 °C. A magnetic stirrer was used to ensure temperature and concentration homogeneity. The temperature was first lowered such that the solution exhibited a single and clear phase. Then, the temperature was raised slowly, and when the solution first became cloudy, indicating the onset of phase separation, was taken as cloud temperature (T_{cloud}).

2.4. Ultrafiltration

The crude extract of *A. oryzae* was concentrated by ultrafiltration using an Amicon System (Amicon Inc., Beverly, MA 01915, USA) fitted with 10 kDa (PM 10) cut-off-point membrane at 10 °C and 2.5 kgf/cm².

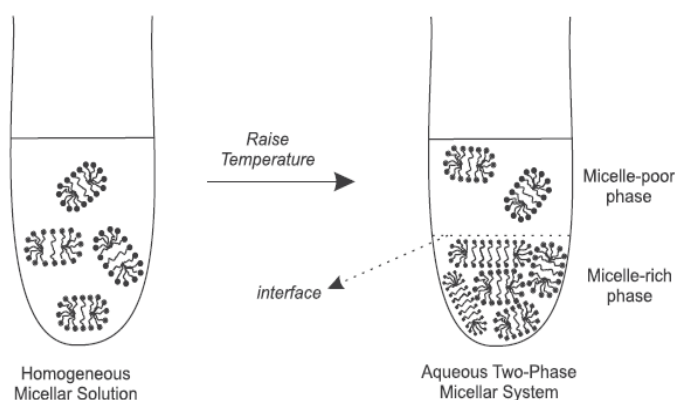


Fig. 1. Schematic illustration of a Triton X-114 micellar solution phase separation, upon temperature increase. Each of the resulting coexisting phases contains cylindrical micelles but at different micellar concentrations. Note also that, on average, the cylindrical micelles in the micelle-rich (bottom) phase are larger than those in the micelle-poor (top) phase [6–10].

2.5. Enzyme and total protein assays

Pectinase activity was determined by mixing 25 μL of enzyme solution with 50 μL of pectin from citrus fruits (10 mg mL^{-1}) at 50°C for 30 min. The release of the reducing sugar was measured using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method [23]. One unit was expressed as μmol reducing sugar formed min mL^{-1} enzyme solution, i.e., as IU mL^{-1} . Galacturonic acid was used as standards.

Total protein concentration was determined by the BCA method, using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) [24]. This method is based on bicinchoninic acid (BCA) for the colorimetric detection and quantitation of total protein. Thus combines the well-known reduction of Cu^{2+} to Cu^{1+} by protein in an alkaline medium (the biuret reaction) with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cuprous cation (Cu^{1+}) using a unique reagent containing bicinchoninic acid [25]. The purple-colored reaction product of this assay is formed by the chelation of two molecules of BCA with one cuprous ion. This water-soluble complex exhibits a strong absorbance at 562 nm that is nearly linear with increasing protein concentrations over a broad working range (20–2000 $\mu\text{g/mL}$). Accordingly, protein concentrations generally are determined and reported with reference to standards of a common protein such as bovine serum albumin (BSA). A series of dilutions of known concentration are prepared from the protein and assayed alongside the unknown(s) before the concentration of each unknown is determined based on the standard curve [24].

2.6. Experimental design

Statistical design was carried out for pectinase extraction using ATPMS, which was evaluated by analysis of variance, at a significance level $p \leq 0.05$ and the extent of variance explained by each model was given by the coefficient of determination, R^2 . A 2^3 factorial design and three replicates in the center point were employed. The factorial design with 02 levels assumes linearity in the effects of the factors. After the experiments at pre-determined conditions, statistical results were treated with the aid of the software Design-Expert 8.02 (Wiley).

2.7. Partitioning of pectinases in Triton X-114 aqueous two-phase micellar systems

Buffered systems, each one with a total mass of 3.0 g were prepared in graduated test tubes (10 mL). Triton X-114 surfactant in different concentrations (%wt/wt) was mixed with Sodium phosphate buffer 50 mM pH 7.0 and with increasing concentrations of the crude extract concentrated %wt/wt (Table 1). The resulting solutions were well mixed. Subsequently, the solutions were placed in a thermo-regulated device, previously set at different temperatures. Solutions were maintained at that temperature for at least 2 h to attain partitioning equilibrium.

After that, the two coexisting micellar phases formed were withdrawn separately with great care, using syringe and needle sets, and the enzymatic activity was determined. The procedure was repeated three times to ensure reproducibility. The

partitioning behavior of enzymes in ATPMS was quantified in terms of the partition coefficient K , defined as follows:

$$k = \frac{C_c}{C_d}$$

where C_c and C_d are Pectinase concentrations in the micelle-rich (concentrated) and micelle-poor (dilute) phases, respectively.

The mass balance (MB) was calculated according to the following equation:

$$MB = \frac{C_c V_c + C_d V_d}{C_i V_i} \times 100\%$$

where C_c , C_d , and C_i are the pectinase concentrations in the micelle-rich phase, micelle-poor phase and in the crude extract concentrated, respectively. V_c , V_d , and V_i are the volumes of the micelle-rich phase, micelle-poor phase and of the crude extract concentrated added to the system, respectively.

The partitioning behavior of the enzyme was also evaluated based on Pectinase recovery (Y) at the phase it partitioned preferentially for each studied system, that is:

$$Y_d = \frac{C_d V_d}{C_i V_i} \times 100$$

3. Results

3.1. Pectinase production

A. oryzae was grown on medium containing passion fruit peel as the carbon source and the highest yield of pectinase activity was observed on the 10th day. The passion fruit peel is an agro-industrial residue rich in pectin, niacin, iron, calcium and phosphorus [26,27]. The ultra filtration process used to concentrate the sample resulted in a product with enzymatic activity equal to (805 U L^{-1}). Such value for pectinase enzyme activity is close to that reported in the literature for other filamentous fungi [28]. However, the enzymatic degradation of passion fruit peel releases different colorful pigments in the fermented medium, like phenolic compounds and carotenoids. Several studies indicate the presence of polyphenols [26,29], polyunsaturated fatty acids [30] and fiber [27], among other classes of substances, which may be a precursor of phenolic compounds to the fermented medium and generating the dark color after the microbial degradation and a possible enzymatic inhibition. The presence of carotenoids in the passion fruit peel has been described by Jairo et al. [31]. Carotenoids are yellow, orange and red lipid-soluble pigments, which occurs in many fruits and vegetables. Such pigments can be found in passion fruit peel and absorb light mostly between 415 nm and 490 nm [31,32]. Enzyme inhibition by phenolic compounds is reported in the literature, especially in concentrated broth, what justifies their removal for future industrial application. In this regard, liquid-liquid extraction meets the industrial interest, by clarifying the culture medium, partitioning the phenolic compound, being regarded as a simple and low cost technique.

3.2. Mapping the coexistence curve of the Triton X-114/buffers systems

Knowledge of the coexistence curve is essential when working with aqueous two-phase micellar systems. The coexistence curve represents the boundary separating the one-phase region from the two-phase region of an appropriate phase diagram. The influence of crude extract in the coexistence curve previously reported by our research group was verified, and a lowering in cloud point values was observed in comparison to the curve in absence of the extract (Fig. 2).

Table 1

Variables values of a 2^3 factorial design with centered face and three repetitions at the central point used to evaluate the influence of temperature, Triton X-114 and enzymatic extract concentrations on pectinase purification for ATPMS.

Variables	-1	0	+1
Temperature ($^\circ\text{C}$)	25	30	35
Triton X 114 (%wt/wt)	4	6	8
Enzymatic extract (%wt/wt)	10	15	20

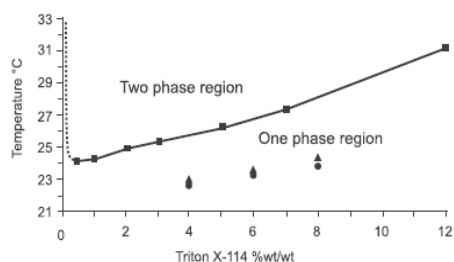


Fig. 2. Experimentally determined phase diagram of the TX-114/buffer micellar system, showing two-phase and one-phase regions [22]. Triangles represent cloud point of the system at 10%wt/wt crude extract (4%Triton 23 ± 0.15 °C; 6%Triton 23.6 ± 0.12 °C; 8%Triton 24.3 ± 0 °C). Circles represent cloud point of the system at 20%wt/wt (4%Triton 22.6 ± 0.06 °C; 6%Triton 23.2 ± 0.12 °C; 8%Triton 23.9 ± 0.06 °C).

3.3. Pectinase partitioning by aqueous two-phase micellar system (Triton X-114/buffer)

A 2^3 factorial design with a centered face and three repetitions at the central point was employed to optimize the pectinase purification by Triton X-114/buffer micellar system. The temperatures and Triton X-114 concentrations for this work were based on the binodal curve in the presence of the crude extract, and on the previous stability studies of pectinases. The evaluation of such aforementioned models led the present work to the variables of Table 1. The obtained experimental results are summarized in Table 2.

As can be seen in Table 2, the yield was calculated based on the pectinase activity. Therefore, the yield above 100% could be due to migration of other proteins that could be inhibiting the pectinase activity to the bottom phase. Furthermore, the removal of phenolics compounds and carotenoids may also have improved enzymatic activity in poor-phase micelle, as discussed in the previous section, leading to a yield greater than 100%. In the literature several works presented yield higher than 100% for enzyme extraction using ATPS [33,34]. Cavalcanti et al. in extraction studies on phospholipase C using PEG/phosphate ATPS obtained yield of 230% [34].

The highest value for yield in the top phase (375.5%) was obtained at run 01 (30 °C, 6% Triton X-114 %wt/wt and 15% crude extract concentrated %wt/wt). On the other hand, the highest enzymatic activity value in top phase was observed in the assay 10, with 25 °C, 8% Triton X-114 %wt/wt and 20% crude extract concentrated %wt/wt. One can figure out that the higher activity obtained in the run 10 is due to a better partition of the enzyme to the top phase when compared to its inhibitors. Thus the chosen dependent variable was the pectinase activity ($U mL^{-1}$), once by

doing this we can reduce the error related to the enzymatic inhibition which probably occurs in the crude extract. Assays at micelle rich-phase were not considered accurate due to surfactant interference with the pectinase assay employed. However, the K values lower than one in all micellar systems indicate that pectinase partitions preferentially to the dilute, micelle-poor phase, owing to the repulsive forces between the enzyme molecules and the micelles.

Moreover, Fig. 3 gives evidence that the micellar system Triton X-114/ buffer selected was effective in the removal of visible colorful pigments. Fig. 3 showed an important decrease in the absorbance value of the sample of the top phase after 400 nm. This result suggested the partition of the pigments to bottom phase. The contaminants partitioned to bottom phase (micelles-rich phase) is probably due to the hydrophobic character of the phase and the compounds [35]. Bordier (1959), showed that hydrophilic proteins partition preferentially into the micelle-poor phase, while hydrophobic or integral membrane proteins partition preferentially into the micelle-rich phase [36].

In addition, the difference between the absorbance values after the system can also be related to the excluded-volume theory. According to this theory, the partitioning of proteins is governed primarily by repulsive, steric, excluded-volume (EV) interactions between the globular hydrophilic proteins and the non-charged micelles. In this case, the proteins partition preferentially into the micelle-poor phase, where they experience fewer excluded-volume interactions with the micelles [37].

Table 3 shows the analysis of variance (ANOVA) including the significant factors for pectinase purification by ATPMS Triton X-114/buffer. Temperature (X_1) and the crude extract concentrated (X_3) in different concentrations (%wt/wt) had significant effects on the enzyme purification ($p \leq 0.05$). Besides, the ANOVA revealed that the coefficient of determination ($R^2 = 0.9548$) and adjusted coefficient of determination (adjusted $R^2 = 0.84934$) were high. The model fit is also verified by the value obtained by the adjusted R^2 . Values above 75% indicate that the factors in the experiment explain large percentage of the observed variation. In this case the adjusted R^2 was equal to 84.93%. If the model adequately represents the phenomenon, the lack of fit test (*lack-of-fit*) should not be significant ($p > 0.05$) [38]. The p -value obtained for the lack of fit test was $p = 0.477659$ (not significant), which indicates that the model is appropriate for this study.

Results of ANOVA are illustrated in Fig. 4, in the Pareto chart for both responses, omitting the less significant interactions. In this chart, the length of each bar is proportional to the standardized effect of the related variable or interaction, and the bars extending beyond the vertical line correspond to the statistically significant effects at a confidence level of 95%. According to the analysis

Table 2
Results of pectinase extraction by ATPMS (Triton X114/buffer) on responses yield in the top phase (Y_{top}) and pectinase activity ($U mL^{-1}$) in the top phase, according to the 2^3 factorial design with centered face and three repetitions at the central point.

Assays	Variables			$U mL^{-1}$	Y (%)
	Temp (°C)	Triton X114 (%)	Crude extract (%)		
1	30	6	15	0.41	375.5
2	30	6	15	0.47	242.1
3	30	6	15	0.49	226.7
4	25	4	10	0.453	174.1
5	35	4	10	0.233	192.4
6	25	8	10	0.391	194.7
7	35	8	10	0.316	216.4
8	25	4	20	0.557	241.0
9	35	4	20	0.439	218.4
10	25	8	20	0.601	261.6
11	35	8	20	0.468	193.9

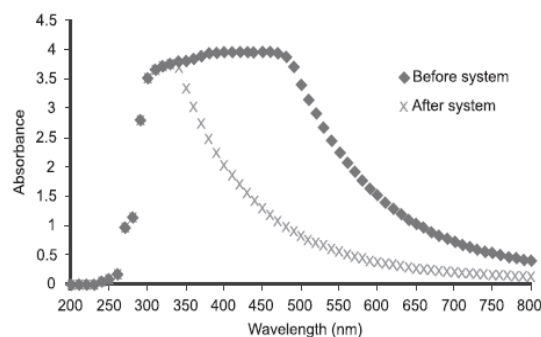


Fig. 3. Evaluation of the visible colorful pigments present in the micelle-poor phase (top-phase) of the ATPMS with the addition of fermented broth.

Table 3

Analysis of variance (ANOVA) for pectinase purification using enzymatic activity in top phase as response variable. The model of second order including as independent variables temperature (X_1), Triton X-114 concentration (X_2) and Crude extract concentration (X_3).

Source	SS	DF	MS	F-value	p-value
Temperature (X_1)	0.037265	1	0.037265	21.49875	0.043502*
Triton X-114 %wt/wt (X_2)	0.001105	1	0.001105	0.63721	0.508448
Crude extract %wt/wt (X_3)	0.056448	1	0.056448	32.56615	0.029361*
1 by 2	0.002112	1	0.002112	1.21875	0.384662
1 by 3	0.000242	1	0.000242	0.13962	0.744554
2 by 3	0.000338	1	0.000338	0.19500	0.701943
1*2*3	0.003200	1	0.003200	1.84615	0.307180
Lack of fit	0.001301	1	0.001301	0.75043	0.477659
Pure error	0.003467	2	0.001733		
Total SS	0.105477	10			

SS = sum of square; DF = degree of freedom; MS = mean of square; $R^2 = 0.9548$.

* Significant at level of 95%.

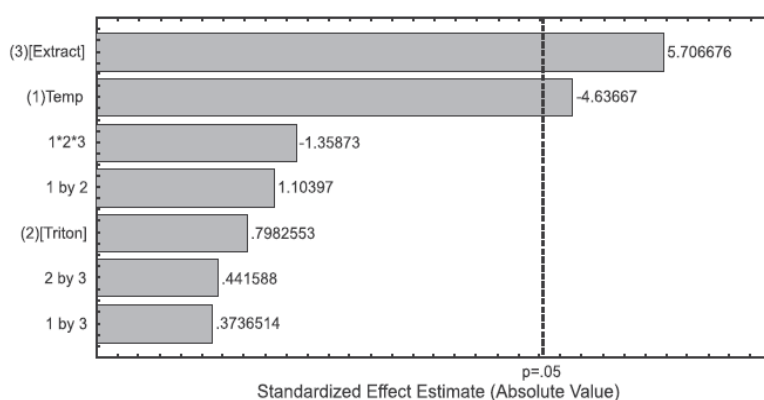


Fig. 4. Pareto chart for the effects of variables temperature (X_1), Triton X-114 concentration (X_2) and Crude extract concentration (X_3) on $U \text{ mL}^{-1}$ in the top phase of pectinase purification by ATPMS.

below, increase in the extract concentration (positive sign) causes increase in pectinase enzymatic activity in top phase, while increase in temperature (negative sign) causes a decrease. No interaction effect was significant. The Triton X-114 concentration was not significant in the tested model. However, the possibility of existing Triton X-114 influence in the partition in other nontested conditions cannot be excluded.

The mathematical model to represent the process of pectinase extraction using ATPMS Triton X-114/buffer, considering the significant variables is described by the Eq. (1).

$$Y_{top} = 0.58975 - 0.01365 \cdot X_1 + 0.01680 \cdot X_3 \quad (1)$$

where Y represents the predicted value for $U \text{ mL}^{-1}$ in top phase and X_1 represents temperature and X_3 represents extract concentration.

This equation shows the best result is found at lower temperature and higher extract concentration. Thus future applications should be tested in conditions close to the indicated in this work.

4. Conclusions

The effective clarification of fermented broth containing pectinase was attained using a simple aqueous two-phase micellar system formed by Triton X-114/buffer. The method was capable of extracting pigments into the micelle-rich phase and the target biomolecule partitioning to the opposite phase. Therefore, the ATPMS presented in this paper represents an important step towards developing a low cost separation method for pectinase.

Acknowledgements

E.X.F.F. acknowledges the receipt of a research fellowship from the Brazilian Research Council (CNPq). P.M.D.J. acknowledges the receipt of a postgraduate maintenance scholarship from CNPq. This work was funded by CNPq (research grants 470265/2011-6, 563260/2010-6 and 563823/2010-0), the Foundation for Research Support of Federal District (Pronex Program) and the National Institute of Science and Technology of Bioethanol. P.O.M. acknowledges the receipt of a research fellowship from the Brazilian Research Council (CNPq) (research grants 564208/2010-8) and Foundation for Research Support of Federal District.

References

- [1] I.B.D.G.E.E.-, IBGE, Produção Agrícola Municipal, in: Brasília, 2009.
- [2] S.G. Kulkarni, P. Vijayanand, Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa* L.), LWT – Food Science and Technology 43 (2010) 1026–1031.
- [3] M. Fernández-González, J.F. Úbeda, T.G. Vasudevan, R.R.C. Otero, A.I. Briones, Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains, FEMS Microbiology Letters 237 (2004) 261–266.
- [4] R. Rajendran, S. Karthik Sundaram, R. Radhai, P. Rajapriya, Bioscouring of cotton fabrics using pectinase enzyme its optimization and comparison with conventional scouring process, Pakistan Journal of Biological Sciences 14 (2011) 7.
- [5] P.G. Mazzola, A.M. Lopes, F.A. Hasmann, A.F. Jozala, T.C.V. Penna, P.O. Magalhaes, C.O. Rangel-Yagui, A. Pessoa Jr, Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques, Journal of Chemical Technology & Biotechnology 83 (2008) 143–157.
- [6] C.-I. Liu, D.T. Kamei, J.A. King, D.I.C. Wang, D. Blankschtein, Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems, Journal of

- Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 711 (1998) 127–138.
- [7] R.A. Ramelmeier, G.C. Terstappen, M.R. Kula, The partitioning of cholesterol oxidase in Triton X-114-based aqueous two-phase systems, *Bioseparation 2* (1991) 315–324.
- [8] P.A. Alred, A. Kozłowski, J.M. Harris, F. Tjerneld, Application of temperature-induced phase partitioning at ambient temperature for enzyme purification, *Journal of Chromatography A* 659 (1994) 289–298.
- [9] P.O. Magalhães, A.M. Lopes, P.G. Mazzola, C. Rangel-Yagui, T.C. Penna, A. Pessoa Jr., Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review, *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences: A Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne des Sciences Pharmaceutiques* 10 (2007) 388–404.
- [10] C.L. Liu, Y.J. Nikas, D. Blankschtein, Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems, *Biotechnology and Bioengineering* 52 (1996) 185–192.
- [11] Y.J. Nikas, C.L. Liu, T. Srivastava, N.L. Abbott, D. Blankschtein, Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions, *Macromolecules* 25 (1992) 4797–4806.
- [12] D. Van roomsalen, M.P.J. Dohmen-speelmans, C.H.J.T. Dietz, L.J.P. Van den broeke, L.A.M. Van der Wielen, J.T.F. Keurentjes, Bioseparations in aqueous micellar systems based on excluded-volume interactions, *Food and Bioproducts Processing* 84 (2006) 51–58.
- [13] H. Lam, M. Kavoozi, C.A. Haynes, D.I.C. Wang, D. Blankschtein, Affinity-enhanced protein partitioning in decyl β -D-glucopyranoside two-phase aqueous micellar systems, *Biotechnology and Bioengineering* 89 (2005) 381–392.
- [14] M.B. Linder, M. Qiao, F. Laumen, K. Selber, T. Hyytiä, T. Nakari-Setälä, M.E. Penttilä, Efficient purification of recombinant proteins using hydrophobins as tags in surfactant-based two-phase systems†, *Biochemistry* 43 (2004) 11873–11882.
- [15] T. Minuth, J. Thömmes, M.R. Kula, A closed concept for purification of the membrane-bound cholesterol oxidase from *Nocardia rhodochrous* by surfactant-based cloud-point extraction, organic-solvent extraction and anion-exchange chromatography, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 23 (1996) 10.
- [16] K. Selber, F. Tjerneld, A. Collén, T. Hyytiä, T. Nakari-Setälä, M. Bailey, R. Fagerström, J. Kan, J. van der Laan, M. Penttilä, M.-R. Kula, Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems, *Process Biochemistry* 39 (2004) 889–896.
- [17] R. Dias, S. Meřnikov, B. Lindman, M.G. Miguel, DNA phase behavior in the presence of oppositely charged surfactants, *Langmuir* 16 (2000) 9577–9583.
- [18] D.T. Kamei, J.A. King, D.I.C. Wang, D. Blankschtein, Understanding viral partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar systems: 2. Effect of entrained micelle-poor domains, *Biotechnology and Bioengineering* 78 (2002) 203–216.
- [19] C.-K. Lee, W.-D. Su, Nonionic surfactant-mediated affinity cloud-point extraction of vancomycin, *Separation Science and Technology* 34 (1999) 3267–3277.
- [20] S. Kapnoor, V.H. Mulimani, Production of α -Galactosidase by *Aspergillus oryzae* through solid-state fermentation and its application in soymilk Galactooligosaccharide hydrolysis, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53 (2010) 211–218.
- [21] Y.J. Nikas, C.L. Liu, T. Srivastava, N.L. Abbott, D. Blankschtein, Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions, *Macromolecules* 25 (1992) 4794–4806.
- [22] A.M. Lopes, P.O. Magalhães, P.G. Mazzola, C.O. Rangel-Yagui, J. de Carvalho, T.C. Penna, A. Pessoa Jr., Green fluorescent protein extraction and LPS removal from *Escherichia coli* fermentation medium using aqueous two-phase micellar system, *Separation and Purification Technology* 81 (2011) 339–346.
- [23] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry* 31 (1959) 426–428.
- [24] T.F.S. Inc., Instructions Pierce BCA Protein Assay Kit, in: Thermo Fisher Scientific Inc.
- [25] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry* 150 (1985) 76–85.
- [26] L.F.D.N. Oliveira, M.R.F. Nascimento, S.V. Borges, P.C.N. Ribeiro, V.R. Ruback, Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) para produção de doce em calda, *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 22 (2002) 5–9.
- [27] K.V.G. Córdova, T.M.M.T.B. Gama, C.M.G. Winter, G.K. Neto, R.J.S. Freitas, Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* FlavicarpaDegener) obtida por secagem, *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos* 23 (2005) 35–42.
- [28] F.G. de Siqueira, A.G. de Siqueira, E.G. de Siqueira, M.A. Carvalho, B.M. Peretti, P.M. Jaramillo, R.S. Teixeira, E.S. Dias, C.R. Felix, E.X. Filho, Evaluation of holocellulase production by plant-degrading fungi grown on agro-industrial residues, *Biodegradation* 21 (2010) 815–824.
- [29] A.E. Zeraik, M. Nitschke, Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: effect of temperature and hydrophobicity, *Current Microbiology* 61 (2010) 554–559.
- [30] C.N. Kobori, N. Jorge, Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais, *Ciência e Agrotecnologia* 29 (2005) 1008–1014.
- [31] J.F.-L. Jairo, H. López-Vargas, José A. Pérez-Álvarez, Manuel Viuda-Martos, Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products, *Food Research International* 51 (2013) 756–763.
- [32] D.B.R.-A. Cristiane, H. Azevedo-Meleiro, Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS, *Journal of Food Composition and Analysis* 17 (2004) 385–396.
- [33] Z.D. Mayerhoff, I.C. Roberto, T.T. Franco, Response surface methodology as an approach to determine the optimal activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase enzymes from *Candida mogii*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 70 (2006) 761–767.
- [34] M.T. Cavalcanti, T.S. Porto, B. de Barros Neto, J.L. Lima-Filho, A.L. Porto, A. Pessoa Jr., Aqueous two-phase systems extraction of alpha-toxin from *Clostridium perfringens* type A, *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 833 (2006) 135–140.
- [35] A.P.-J.CO. Rangel-Yagui, D. Blankschtein, Two-phase aqueous micellar systems – an alternative method for protein purification, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 21 (2004) 531–544.
- [36] C. Bordier, Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution, *The Journal of Biological Chemistry* 256 (1981) 1604–1607.
- [37] D.T. Kamei, J.A. King, D.I. Wang, D. Blankschtein, Separating lysozyme from bacteriophage P22 in two-phase aqueous micellar systems, *Biotechnology and Bioengineering* 80 (2002) 233–236.
- [38] D.C.M. Calado, Planejamento de experimentos usando o Statistica, Rio de Janeiro (2003).

Referências bibliográficas

ALRED, P. A.; KOZLOWSKI, A.; HARRIS, J. M.; TJERNELD, F. Application of temperature-induced phase partitioning at ambient temperature for enzyme purification. **Journal of chromatography. A**, v. 659, n. 2, p. 289–98, 1994.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 3-4, p. 385–396, 2004.

BELL, T. A.; ETCHELLS, J. L.; JR., W. W. G. S.; JR., T. A. B. J. L. E. W. W. G. S.; THOMAS A. BELL, JOHN L. ETCHELLS, WILLIAM W. G. SMART, J. Pectinase and Cellulase Enzyme Inhibitor from *Sericea* and Certain Other Plants. **Enzyme Inhibitor**, v. 126, n. 1, p. 40–45, 1965.

BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **The Journal of biological chemistry**, v. 256, n. 4, p. 1604–7, 1981.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2003.

CAVALCANTI, M. T. H.; PORTO, T. S.; BARROS NETO, B. DE; et al. Aqueous two-phase systems extraction of alpha-toxin from *Clostridium perfringens* type A. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 833, n. 2, p. 135–40, 2006.

CÓRDOVA, K. V. G. K. R. V.; GAMA, T. M. M. T. B. T. M. M. T. B.; WINTER, C. M. G. C. M. G.; NETO, G. K. G. K.; FREITAS, R. J. S. R. J. S. DE. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* Degener) obtida por secagem. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 2005, 2005.

DIAS, R.; MEL'NIKOV, S.; LINDMAN, B.; MIGUEL, M. G. DNA Phase Behavior in the Presence of Oppositely Charged Surfactants. **Langmuir**, v. 16, n. 24, p. 9577–9583, 2000.

FRANCO, T. T.; KILIKIAN, B. V.; COIMBRA, J. S. R.; MEIRELLES, A. J. A. Extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas. In: B. V. Kilikian; A. Pessoa-Jr (Eds.); **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. 1st ed., p.114–166, 2008. Barueri, SP: Editora Manole.

IBGE. **Produção agrícola Municipal-Culturas temporárias e permanentes**. 39th ed. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012.

KAMEI, D. T.; KING, J. A.; WANG, D. I. C.; BLANKSCHTEIN, D. Understanding Viral Partitioning in Two-Phase Aqueous Nonionic Micellar Systems: 2. Effect of Entrained Micelle-Poor Domains. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 2, p. 233–6, 2002.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 5, p. 1008–1014, 2005.

KULKARNI, S. G.; VIJAYANAND, P. Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1026–1031, 2010. Elsevier Ltd.

LAM, H.; KAVOOSI, M.; HAYNES, C. A.; WANG, D. I. C.; BLANKSCHTEIN, D. Affinity-enhanced protein partitioning in decyl beta-D-glucopyranoside two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 89, n. 4, p. 381–92, 2005.

LEE, C.-K.; SU, W.-D. Nonionic Surfactant-Mediated Affinity Cloud-Point Extraction of Vancomycin. **Separation Science and Technology**, v. 34, n. 16, p. 3267–3277, 1999. Taylor & Francis.

LINDER, M. B.; QIAO, M.; LAUMEN, F.; et al. Efficient Purification of Recombinant Proteins Using Hydrophobins as Tags in surfactant-based two-phase systems. **Biochemistry**, v. 43, p. 11873–11882, 2004.

LIU, C. L.; KAMEI, D. T.; KING, J. A.; WANG, D. I.; BLANKSCHTEIN, D. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, v. 711, n. 1-2, p. 127–38, 1998.

LIU, C. L.; NIKAS, Y. J.; BLANKSCHTEIN, D. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 52, n. 2, p. 185–92, 1996.

LOPES, A. M.; MAGALHÃES, P. O.; MAZZOLA, P. G.; et al. Green fluorescent protein extraction and LPS removal from *Escherichia coli* fermentation medium using aqueous two-phase micellar system. **Separation and Purification Technology**, v. 81, n. 3, p. 339–346, 2011.

LÓPEZ-VARGAS, J. H.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 756–763, 2013. Elsevier Ltd. 31/1/2014.

MAGALHÃES, P. O.; LOPES, A. M.; MAZZOLA, P. G.; et al. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques**, v. 10, n. 3, p. 388–404, 2007.

MAYERHOFF, Z. D. V. .; ROBERTO, I. C.; FRANCO, T. T. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 3, p. 217–223, 2004.

MAZZOLA, P. G.; LOPES, A. M.; HASMANN, F. A.; et al. Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 143–157, 2008.

MEEREN, P. VAN DER; COCQUYT, J.; FLORES, S.; DEMEYERE, H.; DECLERCQ, M. Quantifying Wetting and Wicking Phenomena in Cotton Terry as Affected by Fabric Conditioner Treatment. **Textile Research Journal**, v. 72, n. 5, p. 423–428, 2002.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577–99, 2000.

MINUTH, T.; THÖMMES, J.; KULA, M.-R. A closed concept for purification of the membrane-bound cholesterol oxidase from *Nocardia rhodochrous* by surfactant-based cloud-point extraction, organic-solvent extraction and anion-exchange chromatography. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 23, n. 2, p. 107–116, 1996. Wiley.

NIKAS, J.; LIU, C. L.; SRIVASTAVA, T.; ABBOTT, N. L.; BLANKSCHTEIN, D. Protein Partitioning in Two-Phase Aqueous Nonionic Micellar Solutions. **Macromolecules**, v. 25, p. 4797–4806, 1992.

OLIVEIRA, L. F. DE; NASCIMENTO, M. R. F.; BORGES, S. V.; RIBEIRO, P. C. DO N.; RUBACK, V. R. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá (*Passiflora edulis* F. *flavicarpa*) para a produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 259–262, 2002.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; SRINIVAS, N. D.; BARHATE, R. S. Aqueous two phase extraction-an environmentally benign technique. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 5, n. 2, p. 136–141, 2003.

RANGEL-YAGUI, C. O.; PESSOA-JR, A.; BLANKSCHTEIN, D. Two-phase aqueous micellar systems - an alternative method for protein purification. **Brazilian Journal of chemical engineering**, v. 21, n. 04, p. 531–544, 2004.

ROOSMALEN, D. VAN; DOHMEN-SPEELMANS, M. P. J.; DIETZ, C. H. J. T.; et al. Bioseparations in Aqueous Micellar Systems Based on Excluded-Volume Interactions. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, n. 1, p. 51–58, 2006.

SELBER, K.; TJERNELD, F.; COLLÉN, A.; et al. Large-scale separation and production of engineered proteins, designed for facilitated recovery in detergent-based aqueous two-phase extraction systems. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 889–896, 2004.

SIQUEIRA, F. G. DE; SIQUEIRA, E. G. DE; JARAMILLO, P. M. D.; et al. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 20–26, 2010.

TALCOTT, S. T.; PERCIVAL, S. S.; PITTET-MOORE, J.; CELORIA, C. Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 4, p. 935–41, 2003.

TANFORD, C. **The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes**. Segunda ed. New York: Wiley, 1980.

THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. **Instructions Pierce BCA Protein Assay Kit**. .

UENOJO, M.; PASTORE, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388–394, 2007.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; et al. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3-4, p. 170–176, 2010. Elsevier Inc.

APÊNDICE 1

BioEnergy Research (2012) ISSN 1939-1242 DOI 10.1007/s12155-012-9182-6

páginas 768-777

BIOMASS-DERIVED INHIBITORS OF HOLOCELLULASES

Gilvan C. Duarte; Leonora Rios S. Moreira; Paula Marcela D. Jaramillo; Edivaldo Ximenes F. Filho

ABSTRACT

Enzymes constitute a major monetary cost in the bioconversion of holocellulose to ethanol. Identifying enzyme inhibitors and moderating their effects is one approach that may help to overcome this issue. Most inhibitors that reduce the hydrolysis activity of holocellulases are released as the holocellulosic biomass is broken down in the pre-treatment and hydrolysis steps. Recent reports in the literature have shown that the major inhibitors or deactivators of cellulases are phenols and xylooligosaccharides. The bioconversion of hemicelluloses by hemicellulases also has important practical applications in various agro-industrial processes in addition to the conversion of hemicellulosic biomass to fuels and chemicals. Hemicellulases, such as β -xylosidases, may also help alleviate the inhibitory effect of xylooligosaccharides to cellulases. However, compared to cellulases, less is known about the inhibition or deactivation of hemicellulases and pectinases, especially for inhibitors that are generated during pre-treatment and the hydrolysis of lignocellulosic substrates. Considering the importance of such enzymes for the complete degradation of lignocellulosic substrates, this review provides a broad view of the effect of inhibitors of holocellulases (cellulases, hemicellulases, and pectinases).

Keywords Cellulase; Hemicellulase; Phenolic compounds; Xylooligosaccharide; Biomass.

APÊNDICE 2

Microbiologia *in foco* (2012) ISSN: 1982-1301 páginas 17-23

PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO CERRADO BRASILEIRO

Paula Monteiro de Souza; Júlia Almeida Maia; Paula Marcela Duque Jaramillo; Edivaldo Ximenes Ferreira Filho; Pérola Oliveira Magalhães; Adalberto Pessoa Junior

RESUMO

Proteases são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas existentes em moléculas de proteína, dando origem a peptídeos menores e aminoácidos. O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e ocupa 23% do território nacional, abrangendo cerca de 2 milhões de km² do Brasil Central. Para realizar o isolamento dos fungos foi utilizado o método de plaqueamento direto e diluição seriada em placas de Petri contendo os seguintes meios de cultura: DRCB (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol); DG 18 (Dicloran Glicerol 18%); e Ágar Aveia 4% (20g de farinha de aveia, 12,5g de Ágar) contendo antibiótico 100 ppm (Estreptomicina, Penicilina ou Tetraciclina). A metodologia utilizada para seleção dos fungos filamentosos isolados do cerrado do Centro-Oeste brasileiro mostrou que 9 dentre os 17 fungos filamentosos testados apresentaram atividade proteolítica. As espécies de fungos filamentosos que apresentaram formação de halo claro ao redor das colônias nos ensaios para detecção da produção de protease em meio de cultivo sólido foram: *Aspergillus foetidus*, *Fusarium solani*, *Paecylomyces variotti*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium fellutanum*, *Penicillium glandicola* e *Penicillium restrictum*. As maiores atividades proteolíticas em pH 5,0, utilizando azocaseína como substrato, foram apresentadas pelas espécies *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus foetidus*, *Fusarium solani*, *Paecylomyces variotti*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum*. Neste sentido faz-se necessária a otimização do processo fermentativo

dos fungos acima citados que apresentaram expressão de proteases extracelulares em meio líquido, uma vez que com a otimização das variáveis do processo poderá ser possível a indução de maior atividade proteolítica.

Palavras-chaves: Proteases, Cerrado Brasileiro, plaqueamento direto, diluição seriada.

APÊNDICE 3

International Biodeterioration & Biodegradation (2010) ISSN 0964-8305 DOI

10.1016/j.ibiod.2009.10.002 páginas 20-26

THE POTENTIAL OF AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES FOR PRODUCTION OF HOLOCELLULASE FROM FILAMENTOUS FUNGI

Félix Gonçalves de Siqueira; Eliane Gonçalves de Siqueira; Paula Marcela Duque Jaramillo; Marcos Henrique Luciano Silveira; Jürgen Andreus; Fabiana Aparecida Couto; Luís Roberto Batista; Edivaldo Ximenes Ferreira Filho.

ABSTRACT

Fungal species, including *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Emericella nidulans*, *Penicillium citrinum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* and *Paecilomyces lilacinum*, were isolated from cotton processing residues. They were screened for their ability to produce holocellulases when grown in liquid-state media containing agro-industrial residues as the carbon sources. Experiments on the growth of filamentous fungi on culture media containing cotton residue as the carbon source is reported for the first time. For convenience, cultivation conditions (other than temperature) and enzyme assays were the same for all fungi, i.e., no attempt at optimization of individual was made. The objective of this work was to identify fungi and holocellulase (cellulase, hemicellulase and pectinase) of academic interest and as well as of potential commercial application. The pattern of holocellulase production was influenced by the type of agro-industrial residue present in the medium. The best yields of holocellulases were obtained from extracts of *A. oryzae* and *A. terreus*. Enzyme multiplicity was evidenced by fractionation of the crude extracts on ultrafiltration, gel filtration and ion-exchange chromatography procedures and zymogram analysis.

Keywords: Banana stem; Cotton residues; Holocellulose; Holocellulase.

APÊNDICE 4

Biodegradation (2010) ISSN: 0923-9820 DOI 10.1007/s10532-010-9346-z páginas
815-824

EVALUATION OF HOLOCELLULASE PRODUCTION BY PLANT-DEGRADING FUNGI GROWN ON AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES

Félix Gonçalves de Siqueira; Aline Gonçalves de Siqueira; Eliane Gonçalves de Siqueira; Marly Azevedo Carvalho; Beatriz Magalhães Pinto Peretti; Paula Marcela Duque Jaramillo; Ricardo Sposina Sobral Teixeira; Eustáquio Souza Dias; Carlos Roberto Félix; Edivaldo Ximenes Ferreira Filho.

ABSTRACT

Agaricus brasiliensis CS1, *Pleurotus ostreatus* H1 and *Aspergillus flavus* produced holocellulases when grown in solid and submerged liquid cultures containing agro-industrial residues, including sugar cane bagasse and dirty cotton residue, as substrates. These isolates proved to be efficient producers of holocellulases under the conditions used in this screening. Bromatological analysis of agro-industrial residues showed differences in protein, fiber, hemicellulose, cellulose and lignin content. Maximal holocellulase activity (hemicellulase, cellulase and pectinase) was obtained using solid-state cultivation with 10% substrate concentration. In this case, remarkably high levels of xylanase and polygalacturonase activity (4,008 and 4,548 IU/l, respectively) were produced by *A. flavus* when grown in media containing corn residue, followed by *P. ostreatus* H1 with IU/l values of 1,900 and 3,965 when cultivated on 5% and 10% sugar cane bagasse, respectively. *A. brasiliensis* CS1 showed the highest reducing sugar yield (11.640 mg/ml) when grown on medium containing sugar cane bagasse. *A. brasiliensis* was also the most efficient producer of protein, except when cultivated on dirty cotton residue, which induced maximal production in *A. flavus*. Comparison of enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse and dirty cotton residue by crude extracts of *A.*

brasiliensis CS1, *P. ostreatus* H1 and *A. flavus* showed that the best reducing sugar yield was achieved using sugar cane bagasse as a substrate.

Keywords: *Agaricus brasiliensis* CS1; Agro-industrial residue; Holocellulose; Holocellulase; Xylanase; Pectinase.

APÊNDICE 5

Capítulo do livro: FUNGAL BIO-MOLECULES: SOURCES, APPLICATIONS AND RECENT DEVELOPMENTS (no prelo)

Editores: V. K. Gupta, S. Sreenivasaprasad e Robert L. Mach

Editora: Wiley-Blackwell

LIGNOCELLULOSE-DEGRADING ENZYMES: AN OVERVIEW OF GLOBAL MARKET

Paula M. D. Jaramillo, Helder A. R. Gomes, Antonielle V. Monclaro, Caio O. G. Silva, Edivaldo X. F. Filho

ABSTRACT

The commercial enzyme market is a dynamic one that is forecast to show significant growth over the next decade. Enzymes are being used in diverse array of applications in industries, ranging from the food, feed, detergent, paper, leather, biofuel and textile industries and new areas of application are constantly added. Within this scenario of enzyme applications, the lignocellulose-degrading enzymes play a significant role in today's commercial status of biotechnology. However, the production cost and the yields of lignocellulose-degrading enzymes are considered the major problems in commercial exploitation. Lignocellulose represents an abundant carbon-neutral renewable resource for the production of bioenergy and biomaterials. Due to the recalcitrant structure of lignocellulose, a consortium of enzymes differing in their specificity and mechanism of action is needed to act on this substrate. Thus, the use of protein engineering and directed evolution has provided important tools for the efficient development of these enzymes with improved properties for established technical and commercial applications. Here, we reviewed the scenario for lignocellulose-degrading enzymes applications on commercial scale, including the present status and future perspectives.

Keywords: Lignocellulose, enzyme market, ligninase, cellulase, hemicellulase

ANEXO 1

Identificação genotípica do fungo filamentosso *Aspergillus oryzae*

A identificação foi realizada no Laboratório de Microbiologia: Interação Planta-Praga do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília sob a orientação do professor Dr. Robert Miller.

Para efetuar a confirmação da posição taxonômica do fungo por meio de análise molecular, um disco de micélio com 0,7 cm de diâmetro, foi crescido em frascos tipo Erlenmeyer contendo meio de cultura líquido Czapek com extrato de levedura (CYA) (PITT; HOCKING, 1997) por três dias, 28°C, a 120 rpm. A recuperação do micélio foi feita por meio de filtragem com auxílio de uma bomba de vácuo, com lavagens com água destilada previamente esterilizada, para remoção de todo resíduo do meio de cultura. A maceração manual foi conduzida com auxílio de nitrogênio líquido. O DNA genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (RAEDER; BRODA, 1985), contendo no tampão de extração Tris HCl 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM e SDS 0,5% pH 7,0. A quantificação do DNA total foi realizada visualmente por comparação com o marcador padrão Low DNA Mass Ladder[®] (Invitrogen) por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, 5V cm⁻¹, brometo de etídio na concentração de 1 µg mL⁻¹ e U.V. a 254 nm.

A amplificação das regiões espaçadoras intergênicas do DNA ribossomal (rDNA) nuclear (ITS 1 e 2) foi realizada utilizando primers universais ITS5 e ITS4 em uma reação contendo Tampão da Taq platinum[®] (Invitrogen) 1X, MgCl₂ 4 mmol, dNTPs 1 mmol⁻¹, primer *forward* ITS5 e *reverse* ITS4 2,5 mmol⁻¹, Taq polimerase platinum[®] (Invitrogen) 1U e DNA total 20 ng. O programa de termociclagem utilizado foi de desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento do primer de 50°C por 1 minuto, extensão de 72°C por 1 minuto, extensão final de 72°C por 5 minutos e conservação da reação a 10°C. Os três passos de desnaturação do DNA, anelamento e extensão foram repetidos 30 vezes.

O sequenciamento da região rDNA ITS foi realizado em sequenciador ABI 3130xl da Applied Biosystems nos sentidos *forward* e *reverse*, onde a reação de sequenciamento foi conduzida com 15ng do produto da PCR, 3,2 pmol do primer *forward* (ITS5) e 3,2 pmol do primer *reverse* (ITS4), e 3 µl do kit BigDye V3.1 da Applied Biosystems. A análise bioinformática das sequências foi realizada utilizando o programa Sequencher v4.8 (Gene Codes Corporation) para o alinhamento, edição e formação de contigs, e análise BLASTn das sequências contra o banco de dados GenBank no NCBI.

Referências bibliográficas

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. Second ed. Boston, MA: Springer US, 1997.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17–20, 1985.

ANEXO 2

Protocolo substratos para ensaio enzimático

- **Pectina 1%**
 - Pectina de frutas cítricas (Sigma-Aldrich®)
 - Água destilada
- **Xilana 1%**
 - Xilana oat spelt (Sigma-Aldrich®)
 - NaOH 1 M
 - HCl 1 M
 - Tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0
 - Agitar por uma hora e centrifugar por 20 minutos e recuperar o sobrenadante.
- **Carboximetilcelulose 1%**
 - CMC (*low viscosity* - Sigma-Aldrich®)
 - Água destilada
- **Manana 0,5%**
 - Manana (Sigma-Aldrich®)
 - Água destilada

ANEXO 3

Protocolo solução de Karnovsky - microscopia eletrônica de varredura

Solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965)

- 2% de glutaraldeído
- 2% de paraformaldeído
- 3% de sacarose em tampão Cacodilato de Sódio 0,05 M pH 7,3

Referência bibliográfica

KARNOVSKY, M. . A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137–138A, 1965.