

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
PREPARADOS PECTINOLÍTICOS PRODUZIDOS POR *Penicillium
oxalicum* UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação de Mestrado

Lucélia Santi

Porto Alegre, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PREPARADOS
PECTINOLÍTICOS PRODUZIDOS POR *Penicillium oxalicum* UTILIZANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Lucélia Santi

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

ORIENTADORA: Dra. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2005

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein pela oportunidade, confiança, apoio e orientação desde a minha graduação.

As profas. Dra. Célia Carlini e Dra. Elza F. Araújo pelas sugestões durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos profs. Dra Célia Carlini, Dr. Carlos Termignoni e Dra. Elza F. Araújo pela avaliação do meu trabalho

Ao prof. Dr. Augusto Schrank pela leitura da dissertação, confiança e atenção.

A profa. Dra. Fabiana Horn pela leitura do manuscrito e sugestões.

Aos colegas e amigos Márcia, Sydnei, Alexandre Macedo, Broetto, Charley, Lívia, Juliano, Marco Aurélio, César, Luciano, Valéria, Michele, Simone, Markus, Antônio, Renata e Rose pela convivência, apoio, amizade e aprendizado.

A Sílvia e ao Luciano pelo apoio e amizade.

Aos meus grandes amigos Ana Paula, Lucas e Lenise por deixarem a convivência mais alegre durante o desenvolvimento deste trabalho.

A família Beys da Silva pelo apoio e incentivo durante estes anos.

A minha mãe Edeni, meu pai João e meu irmão Diego pelo carinho, compreensão, apoio, estímulo e orgulho.

Ao Walter, meu grande amor, noivo e colega, pelo incentivo, carinho e por ser tão importante na minha vida.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	7
Lista de figuras	8
Lista de tabelas	9
Resumo	10
Abstract	11
1. Introdução	12
1.1. Substâncias pécticas	13
1.2. Pectinases	17
1.2.1. Poligalacturonases (PG)	19
1.2.2. Pectina liase (PL)	22
1.2.3. Pectinesterase (PE)	24
1.2.4. Aplicação das pectinases e mercado mundial	25
1.3. Mercado da indústria de sucos	27
1.3.1. Cítricos	27
1.3.2. Maçã	27
1.3.3. Maracujá	28
1.3.4. Uva	28
2. Objetivos	30
2.1. Objetivo Geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. Materiais e Métodos	31
3.1. Microrganismos e manutenção	31
3.2. Teste de seleção em placa	31
3.3. Teste de micotoxinas	32
3.4. Suspensão de esporos	32
3.5. Cascas de frutas utilizadas	33
3.6. Cultivo de <i>P. oxalicum</i>	33
3.7. Ensaio enzimáticos	33
3.7.1. Poligalacturonase	33
3.7.2. Pectina liase	34
3.7.3. Pectinesterase	34
3.8. Quantificação de proteínas totais	35
3.9. Otimização das condições de produção de pectinases por <i>P. oxalicum</i>	35
3.9.1. Cultivo de <i>P. oxalicum</i> em meio líquido com diferentes fontes de carbono	35
3.9.2. Cultivo de <i>P. oxalicum</i> em meio líquido com diferentes concentrações da fonte de carbono selecionada	36
3.9.3. Cultivo de <i>P. oxalicum</i> em diferentes pH	36

3.9.4. Cultivo de <i>P. oxalicum</i> em diferentes temperaturas	36
3.10. Caracterização dos preparados pectinolíticos	37
3.10.1. Influência do pH sobre a atividade enzimática	37
3.10.2. Influência da temperatura sobre a atividade enzimática	37
3.10.3. Efeito de detergentes	37
3.10.4. Efeito de aditivos e agente redutor	38
3.10.5. Efeito de cátions e agente quelante	38
3.11. Aplicação dos preparados enzimáticos para extração de sucos	39
3.12. Análise estatística	39
4. Resultados	41
4.1. Seleção de microrganismos produtores de pectinases e teste de micotoxinas	41
4.2. Otimização da produção de pectinases utilizando resíduos agroindustriais	45
4.2.1. Fontes de carbono	45
4.2.2. Concentração da fonte de carbono selecionada	50
4.2.3. Efeito do pH do meio de cultivo sobre a produção de pectinases	52
4.2.4. Efeito da temperatura sobre a produção de pectinases	54
4.3. Caracterização dos sobrenadantes dos meios de cultivo otimizados para a produção de pectinases por <i>P. oxalicum</i>	55
4.3.1. Influência do pH sobre a atividade das enzimas	55
4.3.2. Influência da temperatura sobre a atividade das enzimas	57
4.3.3. Efeito de detergentes	57
4.3.4. Efeito de aditivos e agente redutor	59
4.3.5. Efeito de cátions e EDTA	60
4.4. Aplicação dos preparados enzimáticos produzidos por <i>P. oxalicum</i> com atividade de pectinases na extração de sucos de frutas	63
5. Discussão	65
6. Conclusões	75
7. Referências bibliográficas	76
8. Anexo	83

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
A ₂₈₀	absorbância em comprimento de onda igual a 280 nanômetros
cm	centímetro
EDTA	ácido etilodiaminotetracético, sal sódico
g	grama, aceleração da gravidade
h	hora
kDa	quilodaltons = 1.000 daltons
L	litro
M	molar
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
nm	nanômetro
OD	densidade óptica em absorbância em comprimento de onda
p/p	peso por peso
p/v	peso por volume
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PE	pectinesterase
PG	poligalacturonase
pH	potencial de hidrogeniônico
PL	pectina liase
rpm	rotações por minuto
s	segundos
SDS	dodecilsulfato de sódio
Tris	2-amino-2-hidroxi-1,3-propano-1,3-diol
Triton X-100	éter octilfenólico de decaetilenoglicol
Tween	polisorbitano
U	unidade de atividade enzimática
V	volts
v/v	volume por volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pectina	13
Figura 2. Mecanismo de ação das exo-poligalacturonases tipo 1	20
Figura 3. Mecanismo de ação de exo-pectina liase	22
Figura 4. Mecanismo de ação da pectinesterase	24
Figura 5. Metodologia desenvolvida para o ensaio de aplicação dos preparados pectinolíticos produzidos por <i>P. oxalicum</i>	40
Figura 6. Teste em placa para a seleção de microrganismos produtores de pectinases	41
Figura 7. Produção de pectinases em meio líquido dos microrganismos selecionados	44
Figura 8. Atividade de pectinases secretadas por <i>P. oxalicum</i> cultivado em diferentes fontes de carbono	47
Figura 9. Efeito da concentração da fonte de carbono sobre a atividade de pectinases secretadas por <i>P. oxalicum</i>	51
Figura 10. Influência do pH sobre a atividade das pectinases presentes nos sobrenadantes de cultivo de <i>P. oxalicum</i>	56
Figura 11. Influência da temperatura sobre a atividade das pectinases presentes nos sobrenadantes de cultivo de <i>P. oxalicum</i>	58
Figura 12. Aplicação dos preparados enzimáticos com atividade de pectinases produzidos por <i>P. oxalicum</i> na extração de sucos de frutas	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teores médios de pectina em alguns frutos e vegetais	16
Tabela 2. Classificação das enzimas pectinolíticas	18
Tabela 3. Microrganismos testados para a produção de pectinases	42
Tabela 4. Atividade de pectinases secretadas por <i>P. oxalicum</i> cultivado em diferentes fontes de carbono	49
Tabela 5. Efeito do pH do meio sobre a produção de pectinases por <i>P. oxalicum</i>	53
Tabela 6. Efeito da temperatura de cultivo sobre a produção de pectinases por <i>P. oxalicum</i>	54
Tabela 7. Efeito de detergentes sobre a atividade das pectinases presentes nos sobrenadantes de cultivo de <i>P. oxalicum</i>	59
Tabela 8. Efeito de aditivos e agente redutor sobre a atividade das pectinases presentes nos sobrenadantes de cultivo de <i>P. oxalicum</i>	60
Tabela 9. Efeito de cátions e EDTA sobre a atividade das pectinases presentes nos sobrenadantes de cultivo de <i>P. oxalicum</i>	62

RESUMO

Pectinases são enzimas que atuam sobre a pectina, um polissacarídeo presente na parede celular vegetal. Estas enzimas são amplamente utilizadas em diversos segmentos industriais, como indústria de alimentos, sucos e vinhos, tecidos, papel, café e óleos, entre outras.

As pectinases de uma cepa de *Penicillium oxalicum* isolada de casca de laranja foram estudadas. Investigamos o efeito na atividade de pectinases de diferentes resíduos agroindustriais como fonte de pectina, o melhor pH e temperatura para estimular a produção de poligalacturonases, pectina liases e pectinesterases. Procedemos a caracterização dos preparados enzimáticos otimizados para as três enzimas e suas aplicações para a extração de sucos de frutas. Investigamos ainda a produção das micotoxinas aflatoxina e ocratoxina.

A produção máxima de poligalacturonase foi obtida com *P. oxalicum* cultivado em meio contendo casca de maracujá. Casca de laranja estimulou a atividade de pectinesterase e pectina liase. Demonstramos ainda que os preparados enzimáticos produzidos por *P. oxalicum* promovem a extração de sucos, de cor e reduzem a turbidez e a viscosidade dos sucos, tendo alto potencial de aplicação industrial.

ABSTRACT

Pectinases are enzymes that degraded pectin, a polysaccharide present in plant cell wall. These enzymes are used in different industrial applications, as in the production of juices and wines, degumming tissues, paper, coffee and oil.

Pectinases from a strain of *Penicillium oxalicum* isolated from orange peel was studied. The effect of different agroindustrial residues as source of pectin, the best pH and temperature to improve polygalacturonase, pectin lyase and pectinesterase production were analyzed. We also characterized enzymatic extracts for three enzymes and its application for juice extraction. The production of mycotoxins, aflatoxin and ochratoxin from *P.oxalicum* were also analyzed.

The maximum polygalacturonase production was achieved with *P. oxalicum* growing in a medium containing passion fruit peel; for pectinesterase and pectin lyase orange peel have highest activity. We demonstrate that enzymatic extracts produced by *P. oxalicum* promote the extraction of juice, color and reduced the turbidity and viscosity of juices, having industrial application potential.

1. INTRODUÇÃO

As pectinases, enzimas que atuam sobre substâncias pécicas presentes em células vegetais, são utilizadas amplamente em diversos segmentos industriais importantes, como indústrias de alimentos, sucos e vinhos. Porém, outras aplicações têm surgido, como degomagem e tratamento de fibras naturais, extração de café e preparação de celulose na indústria de papel (TANNER *et al.*, 1993; BLANDINO *et al.*, 2001; KASHYAP *et al.*, 2001; HOONDAL *et al.*, 2002).

No Brasil, tem-se observado nos últimos anos, um aumento da produção de sucos de frutas (MAPA, 2005), levando conseqüentemente a um aumento da demanda de enzimas pécicas. Porém, muitas destas indústrias dependem exclusivamente de enzimas importadas. No contexto industrial do Rio Grande do Sul, as pectinases são utilizadas em grande escala para a produção de vinho e sucos de frutas, especialmente maçã e uva. Estas enzimas são aplicadas visando aumentar o rendimento de extração de suco e clarificação dos mesmos.

A indústria brasileira de sucos gera grandes quantidades de resíduos agroindustriais (cascas e bagaços). Estes resíduos, formados principalmente de celulose e pectina, constituem-se em uma alternativa barata e vantajosa para a produção de enzimas, incluindo as pectinases.

1.1 Substâncias pécticas

As células vegetais são envolvidas por uma matriz extracelular rígida, conhecida como parede celular, responsável por algumas das características exclusivas destes organismos. A parede celular é composta por microfibrilas de celulose entrelaçadas em uma matriz complexa que apresenta outras moléculas, como hemicelulose, proteínas e pectina (ALBERTS *et al.*, 1997).

Substâncias pécticas, também conhecidas como pectina, são polissacarídeos ácidos estruturais que ocorrem principalmente na lamela média e parede primária de células de vegetais superiores, contribuindo para dar firmeza, estrutura aos tecidos e resistência à compressão (ALKORTA *et al.*, 1998, GUMMANDI & PANDA 2003). A pectina está também envolvida na interação entre planta-patógeno e na textura das frutas e vegetais durante o crescimento, amadurecimento e armazenamento (THAKUR *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2005).

Como muitos polissacarídeos, a pectina é heterogênea quanto a sua estrutura química, variando de acordo com a fonte, extração e fatores ambientais. Quimicamente, a pectina é formada por uma cadeia central de algumas centenas a quase mil resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações $\alpha,1-4$. Ligados a esta cadeia podem ser encontrados resíduos de ramnose. Os grupos carboxílicos dos ácidos galacturônicos podem ser parcialmente esterificados a grupamentos metil e parcialmente ou completamente neutralizados por sódio, potássio ou amônia. A pectina apresenta ainda cadeias laterais formadas por moléculas de arabinose, galactose e xilose ligados covalentemente aos carbonos 2 e 3 dos

resíduos de ácido galacturônico ou ao carbono 4 dos resíduos de ramnose (REXOVÁ-BENKOVÁ & MARKOVIC, 1976; ALKORTA *et al.*, 1998; KASHYAP *et al.*, 2001; GUMMANDI & PANDA, 2003; OLSSON *et al.*, 2003).

O conteúdo de metoxila pode variar com a origem da pectina, sendo que a variação que ocorre em frutas, está condicionada ao seu desenvolvimento e amadurecimento. Na parede primária das células vegetais, a pectina apresenta maior proporção de oligossacarídeos na cadeia principal, sendo as cadeias laterais mais longas que as encontradas na lamela média (SAKAI *et al.*, 1993).

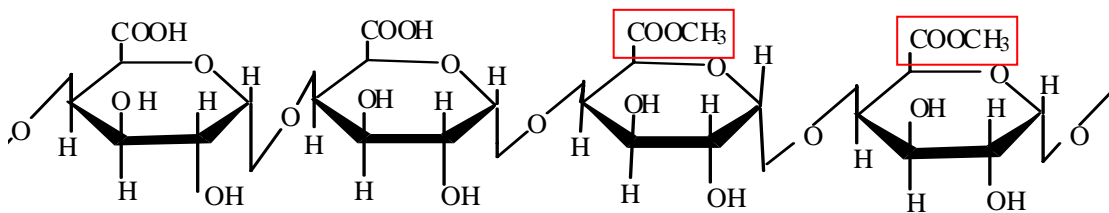


Figura 1- Estrutura da pectina. Estrutura linear da pectina, conhecida como homogalacturano. Grupos carboxílicos metilados destacados em vermelho.

Baseado no tipo de modificação da cadeia central, as substâncias pécicas são classificadas em (KASHYAP *et al.*, 2001):

Protopectina: insolúvel em água, sendo decorrente tanto do tamanho da molécula como pela presença de cátions divalentes. Representa a maior parte da pectina de frutas imaturas.

Pectina: material solúvel no qual pelo menos 75% dos grupamentos carboxílicos são metilados. Apresenta solubilidade em água e em alguns solventes como formamida e glicerol.

Ácido pectínico: ácido poligalacturônico que apresenta um número significativo de grupos metoxila. Pode formar gel com açúcares e ácidos e, caso o conteúdo destes grupos seja reduzido, pode formar gel com alguns íons metálicos.

Ácido péctico (pectato): ácido poligalacturônico coloidal e isento de grupos metoxila.

Em frutos não maduros, a protopectina complexa-se com a celulose, conferindo rigidez à célula. Com o amadurecimento do fruto, sua estrutura é alterada, passando para a fase solúvel, o que resulta em um amolecimento do tecido (KASHYAP *et al.*, 2001).

A pectina é parte importante da biomassa de frutos e vegetais, constituindo entre 4-30% da casca de frutas cítricas (KAUR *et al.*, 2004). A Tabela 1 apresenta os teores de pectina em alguns tipos de frutos e vegetais:

Tabela 1- Teores médios de pectina em alguns frutos e vegetais.

Fonte	Pectina (g/100g matéria úmida)
Maçã (<i>Malus</i> sp.)	0,5 – 1,6
Caqui (<i>Diospyros kaki</i>)	0,6
Polpa de beterraba (<i>Beta vulgaris</i>)	1,0
Laranja (<i>Citrus cinensis</i>)	4,0 – 30
Morango (<i>Fragaria ananassa</i>)	0,6 – 0,7
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	0,2 – 0,6
Maracujá (<i>Passiflora edulis</i>)	15 – 40
Uva (<i>Vitis vinifera</i>)	0,2 – 1,0

Fonte: THAKUR *et al.*, 1997; UHLIG, 1998; KAUR *et al.*, 2004.

Por sua capacidade de formar gel na presença de íons cálcio, a pectina é utilizada na indústria de alimentos para a produção de geléias e em alimentos congelados e, mais recentemente, em alimentos com baixas calorias. Na indústria farmacêutica, a pectina é utilizada para reduzir os níveis de colesterol no sangue e no tratamento de desordens gastrointestinais (THAKUR *et al.*, 1997). Além disso, foi relatado o efeito da pectina e de seus produtos de degradação no combate ao câncer de colon (OLANO-MARTIN *et al.*, 2003).

A pectina é responsável pela consistência e turbidez dos sucos de frutas (ALKORTA *et al.*, 1998). Porém, na indústria de sucos e vinhos, isso torna-se muitas vezes um problema, causando um considerável aumento na viscosidade, dificultando os processos de prensagem, filtração e subsequente concentração, diminuindo assim, o rendimento da extração de sucos.

1.2 Pectinases

Diversos organismos são capazes de produzir pectinases, incluindo plantas, bactérias, algumas leveduras, fungos filamentosos e organismos simbiotes de animais (AGUILAR & HUITRON, 1987; LADJAMA *et al.*, 1991; FERNANDES-SALOMÃO *et al.*, 1996; PRADE *et al.*, 1999; SIROTEK *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2005). Porém, estudos de produção de pectinases são mais abundantes para fungos filamentosos, uma vez que as enzimas comerciais são provenientes destes microrganismos e o pH ideal para suas atividades aproxima-se do valor de pH de muitos sucos de frutas, na faixa de 3,0 a 5,5 (UEDA *et al.*, 1982). A produção de pectinases, assim como de outras enzimas, é influenciada por fatores como fonte de carbono, pH e temperatura, entre outros.

Na maioria dos casos, o fungo *Aspergillus niger* é utilizado para produção industrial, já que é classificado como GRAS (*generally recognized as safe*) pelo *Food and Drug Administration* (FDA), órgão do governo dos Estados Unidos responsável pelo controle dos alimentos e medicamentos. Entretanto, nos últimos anos, pesquisas com fungos do gênero *Penicillium* spp. têm demonstrado que alguns isolados são produtores promissores de pectinases (BARACAT *et al.*, 1989; FERNANDES-SALOMÃO *et al.*, 1996).

Embora a pectina apresente outros açúcares em sua composição, o termo enzimas pectinolíticas, ou pectinases, refere-se ao grupo de enzimas que agem sobre os resíduos de ácido galacturônico. Devido à presença de várias formas de pectina nas células das plantas, são necessárias pectinases com diferentes formas de ação para sua degradação (GUMMANDI & PANDA, 2003). Estas

enzimas podem ser induzidas por substratos pécnicos ou produzidas constitutivamente, dependendo do organismo estudado (MALDONADO & STRASSER de SAAD, 1998).

Sua classificação é baseada de acordo com o substrato preferencial, mecanismo de ação e sítios de clivagem, resultando em dois grupos principais: despolimerizantes e desmetoxilantes (ALKORTA *et al.*, 1998; KASHYAP *et al.*, 2001). As enzimas desmetoxilantes agem removendo grupos metil da cadeia principal, enquanto as enzimas despolimerizantes rompem as ligações α ,1-4 entre monômeros de ácido galacturônico, tanto por hidrólise (hidrolases) quanto por trans-eliminação (liases). Um resumo desta classificação está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2- Classificação das enzimas pectinolíticas.

PECTINASES DESPOLIMERIZANTES		
Enzima	Modo de ação	Substrato preferencial
Poligalacturonase (PG)	hidrólise de ligações α ,1-4 endo-PG ou exo PG 1 (monômeros) e exo-PG 2 (dímeros)	Ácido pécnico
Polimetilgalacturonase (PMG)	hidrólise endo-PMG ou exo-PMG	Pectina
Pectina liase (PL)	trans-eliminação endo-PL ou exo-PL	Pectina
Pectato liase (PAL)	trans-eliminação endo-PL ou exo-PL	Ácido pécnico
PECTINASE DESMETOXILANTE		
Pectinesterase (PE)	desesterificação de grupos metil	Pectina

Fonte: ALKORTA *et al.*, 1998; KASHYAP *et al.*, 2001.

As enzimas integrantes do grupo de pectinases despolimerizantes têm como função degradar o polímero de pectina ou ácido péctico via hidrólise ou trans-eliminação. Integram este grupo de enzimas as *hidrolases*: a) polimetilgalacturonases (PMG), que têm como substrato preferencial a pectina, e b) poligalacturonases (PG), que atuam preferencialmente sobre ácidos pécticos. Também fazem parte deste grupo as *liases*: a) pectina liase (PL), que tem preferência por pectina e b) pectato liase (PGL) que tem preferência por ácido péctico.

1.2.1. Poligalacturonases – PG

As poligalacturonases catalisam a hidrólise de ligações $\alpha,1-4$ entre resíduos de ácido galacturônico não esterificados. Apresentam como substratos preferenciais ácidos pécticos ou ácidos poligalacturônicos com baixo grau de esterificação. Sua ação pode se dar internamente à cadeia principal, liberando oligômeros (endo-PG) ou na extremidade não-redutora, liberando monômeros (exo-PG).

A hidrólise ao acaso das ligações internas da cadeia de ácido poligalacturônico, catalisada pela endo-poligalacturonase (endo-PG) (EC 3.2.1.15), resulta em uma redução pronunciada da viscosidade de uma solução. Pode-se obter 50% de redução de viscosidade com apenas 2-3% de quebra das ligações glicosídicas (FOGARTY & KELLY, 1983). Para esta enzima, quanto maior o grau de esterificação, menor a velocidade e a proporção de hidrólise, uma vez

que sua ação catalítica é facilitada na presença de grupos carboxílicos livres (ROUMBOUTS & PILNIK, 1980). As endo-PG são produzidas por uma grande variedade de organismos, como fungos filamentosos, bactérias, leveduras, plantas superiores e alguns nematóides parasitos de plantas.

As exo-poligalacturonases (exo-PG) catalisam a hidrólise das ligações terminais $\alpha,1-4$ da cadeia de ácido poligalacturônico por hidrólise (Figura 2). Entre as exo-PG, dois grupos podem ser diferenciados através do produto final liberado: exo-PG1 (EC 3.2.1.67) que liberam monômeros de ácido galacturônico e exo-PG2 (EC 3.2.1.82) que liberam dímeros (DA SILVA *et al.*, 1997).

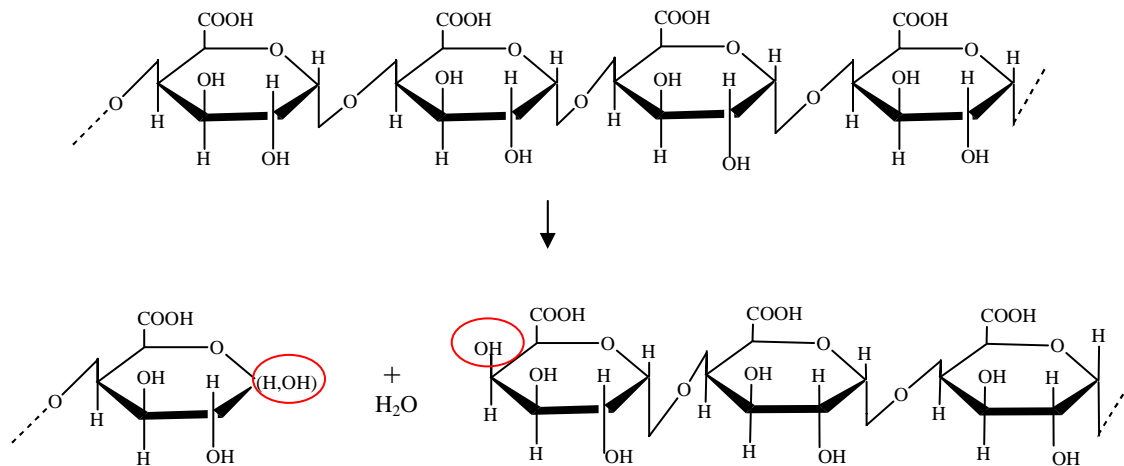


Figura 2- Ação das exo-poligalacturonases tipo 1 sobre ácido poligalacturônico. Ocorre a liberação de um monômero de ácido galacturônico por hidrólise da molécula de pectina não esterificada.

À medida que os substratos são hidrolisados pelas *exo-PG*, observa-se um considerável aumento da concentração de grupos redutores, causada pela liberação de monômeros de ácido galacturônico, e por um lento decréscimo da viscosidade das soluções. Segundo REXOVÁ-BENKOVÁ & MARKOVIC (1976), uma redução de 50% da viscosidade só é alcançada quando cerca de 35-40% das ligações glicosídicas são hidrolisadas por esta poligalacturonase. As *exo-PG* são encontradas em diferentes frutos e vegetais e podem também ser produzidas por fungos filamentosos e bactérias.

Para fungos fitopatogênicos, as poligalacturonases parecem atuar como um fator de virulência, degradando a pectina presente na parede celular e aumentando a acessibilidade para degradação por outras enzimas, ocasionando a lise celular e a destruição dos tecidos da planta (MARTÍNEZ *et al.*, 1991; LANG & DÖRNENBURG, 2000). Já em plantas, estas enzimas desempenham funções importantes, como o reconhecimento de sinais liberados pela ação de fitopatógenos e herbívoros, o que ativa respostas de defesa (BERGEY *et al.*, 1999). Além disso, as *PGs* são imprescindíveis para o amadurecimento de frutos (HADFIELD & BENNETT, 1998).

PGs de frutas geralmente são inativadas durante o seu processamento industrial e, por isso, adicionam-se enzimas exógenas. Altos níveis de *PG* são usados para a produção de alimentos infantis e para estabilização do suco de laranja (SILVA *et al.*, 2005). Estas enzimas são utilizadas durante a maceração de frutas e para a extração e a clarificação de vinhos e sucos (LANG & DÖRNENBURG, 2000).

Pela característica da liberação de seus produtos, a determinação da atividade enzimática das poligalacturonases pode ser realizada pela medida da redução de viscosidade de uma solução (para endo-PG) ou pelo aumento da concentração de açúcares redutores (para exo-PG).

1.2.2. Pectina liase – PL

Pectina liases rompem as ligações $\alpha,1-4$ entre resíduos de ácido galacturônico pelo mecanismo de trans-eliminação, formando uma dupla ligação entre os carbonos 4 e 5 (Figura 3). Esta enzima pode ser subdividida em endo-PL e exo-PL, liberando oligômeros ou monômeros de ácido galacturônico, respectivamente.

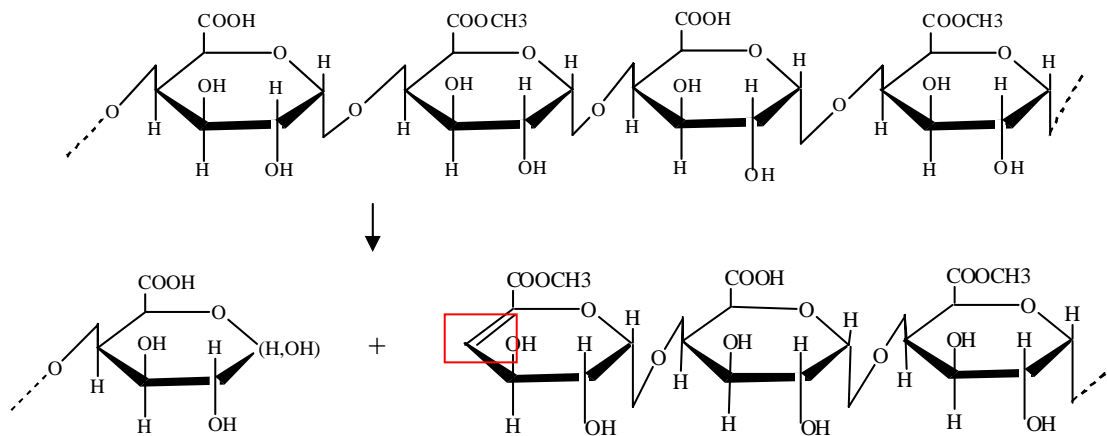


Figura 3- Ação de exo-pectina liase sobre pectina. Notar a dupla ligação gerada pela ação desta enzima (caixa vermelha).

As pectina liases clivam preferencialmente substratos com alta metilação, diminuindo a afinidade pelo substrato com a diminuição do grau de esterificação (REXOVÁ-BENKOVÁ & MARKOVIC, 1976). Por esta razão, é a única pectinase capaz de despolimerizar, sem a ação anterior de outras enzimas, moléculas de pectina altamente esterificada, diminuindo a viscosidade e a clarificação de sucos, sem comprometer o conteúdo de ésteres voláteis responsáveis pelo aroma de várias frutas (ALAHÑA *et al.*, 1990). Muitas PLs são ativadas por cálcio (UHLIG, 1998).

Estas enzimas são produzidas quase que exclusivamente por fungos filamentosos e são, em sua maioria, extracelulares (REXOVÁ-BENKOVÁ & MARKOVIC, 1976; SILVA *et al.*, 1993). Entre os fungos, destacam-se os do gênero *Penicillium*, como *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium griseoroseum* e *Penicillium oxalicum* (utilizado neste trabalho), pelas características e quantidades de enzima secretada (ALAHÑA *et al.*, 1990). Nos últimos anos, diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos objetivando a produção e a caracterização destas enzimas (ALAHÑA *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 1993; BARACAT-PEREIRA *et al.*, 1994; MINUSSI *et al.*, 1998). Porém, ainda faltam informações quanto às propriedades e aplicações das mesmas.

Nas infecções causadas por fungos fitopatogênicos, estas enzimas, juntamente com PGs, são responsáveis pelo apodrecimento de frutos e vegetais durante a estocagem (COLLIMER & KEEN, 1986). PLs de fungos não patogênicos atuam na deterioração de matéria orgânica morta. Além disso, estas enzimas têm um papel importante na indústria têxtil e de alimentos (SILVA *et al.*, 1993).

1.2.3. Pectinesterase – PE

As pectinesterases (EC 3.1.1.11) são pectinases conhecidas como desmetoxilantes (ou desesterificantes) que catalisam a hidrólise de grupamentos metoxil da pectina, liberando metanol (Figura 4).

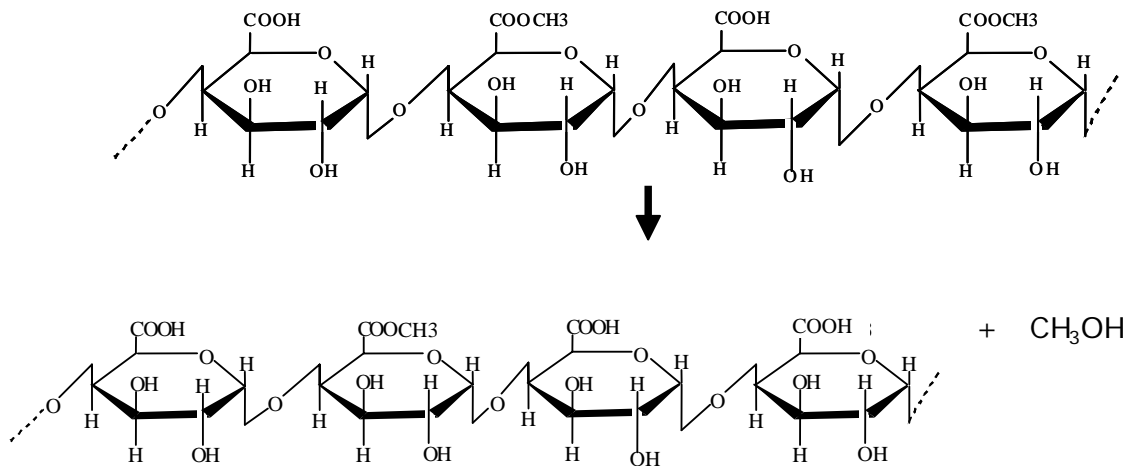


Figura 4- Ação da pectinesterase sobre a molécula de pectina. A enzima pectinesterase atua sobre pectina altamente metoxilada, liberando metanol.

A ação da PE tem pouco efeito sobre a viscosidade das soluções. Esta enzima atua sobre a pectina de alta metoxilação e a transforma em pectina de baixa metoxilação, sendo, portanto, imprescindível para a ação de outras pectinases, como as poligalacturonases, uma vez que estas atuam sobre pectina de baixa metoxilação.

Estas enzimas são produzidas por plantas, fungos filamentosos, algumas bactérias e leveduras. Além de auxiliar fitopatógenos no processo de infecção em plantas, nutrição e atuar no amadurecimento de frutos, estas enzimas têm um papel importante na indústria de alimentos, disponibilizando pectina de baixa metoxilação para as PGs e para utilização em alimentos com baixas calorias (VILARIÑO *et al.*, 1993; AIZENBERG *et al.*, 2002).

1.2.4 Aplicação das pectinases e mercado mundial

As pectinases são enzimas empregadas em grande proporção em diversos segmentos industriais. Sua utilização em escala comercial iniciou-se a partir de 1930 para a preparação de sucos e vinhos (KASHYAP *et al.*, 2001). Na indústria de alimentos, estas enzimas são aplicadas para a maceração de polpas durante o processamento das frutas, na extração e clarificação de sucos e na indústria de vinhos, de papel e de tecidos, entre outras.

A extração de sucos inicia-se com a prensagem das frutas. Porém, este método pode gerar alguns problemas como excesso de viscosidade e turbidez pela formação de partículas insolúveis, especialmente quando são utilizadas frutas ricas em pectina. A pectina é a principal causa da viscosidade de sucos e da manutenção de partículas em suspensão, uma vez que estas partículas são formadas pela interação eletrostática entre pectina, proteínas e taninos. Pectinases degradam parcialmente a pectina destas partículas, expondo as cargas positivas das proteínas. Desta forma, as partículas se unem e precipitam. A utilização de pectinases neste processo acarreta em um aumento na extração de

sucos, extração de pigmentos das frutas e clarificação (ALKORTA *et al.*, 1998; KAWANO *et al.*, 1999; KASHYAP *et al.*, 2001).

As pectinases, associadas com outras enzimas hidrolíticas como celulases e xilanases, vem sendo estudadas visando a aplicação na extração de diferentes óleos vegetais, como óleo de palmeira, de oliva, de soja e de dendê (BOUVIER & ENTRESSANGLES, 1992; FREITAS *et al.*, 1997; KASHYAP *et al.*, 2001).

Outra aplicação importante é na indústria têxtil, que utiliza pectinases alcalinas, especialmente para o tratamento de fibras naturais como o rami e o linho, com o objetivo de facilitar a degomagem das fibras e reduzir o impacto ambiental gerado por resíduos deste segmento industrial (BARACAT *et al.*, 1989; SHARMA & SATYANARAYANA, 2005). Outras aplicações ainda são estudadas, como para a produção de protoplastos, indústrias de papel, de café e de chás (BORIN *et al.*, 1996; KASHYAP *et al.*, 2001; SHARMA & SATYANARAYANA, 2005). Pectinases de microrganismos não patogênicos estão também envolvidas na decomposição de material orgânico vegetal, contribuindo para o ciclo do carbono (ALAÑA *et al.*, 1990; SILVA *et al.*, 1993).

O mercado mundial de enzimas movimentou, em 1995, US\$ 1 bilhão. Estima-se para 2005, um aumento no consumo, na ordem de US\$ 1,7-2 bilhões (KASHYAP *et al.*, 2001). Segundo ALKORTA *et al.* (1998) o mercado de pectinases responde por $\frac{1}{4}$ do mercado mundial de enzimas. No Brasil, o mercado estimado de pectinases é de aproximadamente R\$ 6 milhões/ano (LNF, 2005). Entretanto, em vista da escassez de dados e em virtude do aumento da produção de sucos de frutas, o mercado de pectinases é provavelmente muito maior.

1.3 Mercado da indústria de sucos

1.3.1 Cítricos

A cadeia de cítricos compreende as frutas *in natura*, a produção de sucos (concentrado, reconstituído, pasteurizado e fresco), de óleos essenciais e farelo de polpa seca. As frutas cítricas são as mais cultivadas em todo o mundo, compreendendo uma produção de 106,6 milhões de toneladas em 2001 (ABECITRUS, 2005). No Brasil, observa-se um aumento na demanda de suco pasteurizado embalado onde, em 1999, já alcançava 160 milhões de litros produzidos (MAPA, 2005).

A produção de laranja, principal fruto cítrico, e a industrialização do suco concentram-se em quatro países, sendo o Brasil o principal produtor e exportador, abrangendo 47% do mercado mundial, tendo movimentado no ano passado cerca de US\$ 85 milhões em suco (SECEX, 2005; MAPA, 2005). A grande quantidade de resíduos gerados nesta área são destinados à compostagem e a produção de ração animal.

1.3.2. Maçã

A maçã é comercializada na forma fruta *in natura*, sucos concentrados e alimentos infantis. O Brasil movimentou, em 2004, cerca de US\$ 83 mil em suco e produziu cerca de 850 mil toneladas da fruta (MAPA, 2005). O Rio Grande do Sul

é o segundo maior produtor desta fruta, especialmente na região de Vacaria, onde o clima é favorável para o cultivo.

1.3.3. Maracujá

No Brasil, a cultura do maracujá vem crescendo a cada ano. O país é, hoje em dia, um grande produtor e exportador da fruta, destacando-se o estado do Pará, com mais de um terço da produção nacional, que é de aproximadamente 300 mil toneladas (BIBVIRT, 2005). Mais da metade da produção nacional de maracujá é exportada sob a forma de suco. Fato interessante nesta fruta é que a casca perfaz 65-70% do total do fruto, onde a quantidade de pectina é de 40% da mesma. Por seu aroma e sabor característicos, a produção de maracujá vem crescendo a cada ano, o que indica um aumento na quantidade de casca que é, na maioria dos casos, utilizada como adubo ou na produção de ração para animais.

1.3.4. Uva

O mercado desta fruta vem crescendo a cada ano, tanto para a produção de sucos e vinhos quanto para a comercialização da fruta *in natura*. O Rio Grande do Sul é o maior produtor de uva do Brasil. O movimento gerado por este mercado foi de US\$ 900 mil/2004, perdendo apenas para a comercialização da laranja, principal produto de exportação brasileiro (MAPA, 2005).

No estado, a região da Serra Gaúcha tem recebido destaque pela produção da fruta, com a safra deste ano atingindo 500 mil toneladas (ABE, 2005). Os resíduos gerados por esta indústria alcançaram cerca de 150 toneladas, sendo depositados em aterros ou utilizados como adubo orgânico (ABE, 2005).

Com o aumento da demanda de energia, a atenção mundial tem se voltado para a utilização de fontes renováveis, particularmente resíduos agroindustriais e florestais, que são compostos ricos em celulose, lignina, amido, xilano e pectina (KAUR *et al.*, 2004). Como observado, o Brasil tem um alto potencial para a produção de sucos de frutas, o que vem aumentando a cada ano. Desta forma, a quantidade de resíduos gerados por este segmento industrial vem crescendo, sem ser dado um destino apropriado a estes. Portanto, os resíduos gerados pelas indústrias de sucos podem ser empregados para a produção de enzimas pectinolíticas, diminuindo, assim, os custos de produção.

Neste trabalho, foi realizado um estudo de produção e caracterização de preparados pectinolíticos para poligalacturonase, pectina liase e pectinesterase utilizando resíduos agroindustriais, bem como a aplicação dos mesmos para extração de sucos de frutas como uva, laranja e maçã.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar, em escala laboratorial, a produção de pectinases por fungos filamentosos visando a obtenção de preparados enzimáticos utilizando resíduos agroindustriais, bem como a caracterização e a aplicação dos mesmos.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar microrganismos provenientes de fontes ricas em pectina.
- Selecionar fungos filamentosos produtores de pectinases.
- Definir um meio de cultivo economicamente viável que favoreça a produção de pectinases.
- Caracterizar os preparados enzimáticos obtidos.
- Testar os preparados enzimáticos obtidos na extração de sucos de frutas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismo e manutenção

P. oxalicum (Curie & Tom) foi isolado de casca de laranja e classificado de acordo com PITT (2000) pelo laboratório da profa. Maria Inez Sarquis (FIOCRUZ). O fungo foi mantido em meio Souza (extrato de levedura 0,1%, pectina cítrica 1%, ágar 1,5%, 0,1%(NH₄)₂SO₄, 0,09% K₂HPO₄ e KH₂PO₄, 0,01% MgSO₄, pH 5,0 (p/v)) (SOUZA *et al.*, 2003) a 4°C.

3.2. Teste de seleção em placa

Inicialmente, diversos fungos filamentosos foram testados por seleção em placa para pectinases. A metodologia utilizada foi modificada de HANKIN & ANAGNOSTAKIS (1975). O meio, composto por 0,1% extrato de levedura, 1,5% ágar, 0,5% pectina cítrica, 0,1% (NH₄)₂SO₄, 0,09% K₂HPO₄, 0,09% KH₂PO₄ e 0,01% MgSO₄, teve o pH ajustado para 5,0. Os microrganismos foram inoculados e cultivados em placa contendo o meio seletivo (0,5 cm de altura) por 72h a 28°C. Após este período, três círculos de 0,5 cm de diâmetro foram retirados da região de crescimento de hifas jovens e colocados sobre uma placa nova do mesmo meio contendo 0,5 cm de espessura. As placas foram incubadas por 24h a 28°C e, após este período, foi adicionado vermelho de rutênio 0,02% para visualização do halo de degradação (Figura 6).

3.3. Teste de micotoxinas

P. oxalicum foi testado quanto à produção das micotoxinas aflatoxina (B1, B2, G1 e G2) e ocratoxina. O experimento foi realizado no laboratório de Toxicologia do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA)– UFRGS. A metodologia de LIN & DIANESE (1976) foi utilizada para indução da secreção destas micotoxinas. A análise foi realizada em cromatografia de camada delgada (TLC) com sílica gel 60 como suporte e como fase móvel, utilizando tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (35: 25: 25: 10).

Linhagens de *Aspergillus* spp. selecionadas no ensaio em placa também foram analisadas quanto à produção de micotoxinas.

3.4. Suspensão de esporos

P. oxalicum foi cultivado em placas de Petri contendo meio Souza sólido (item 3.1.) por incubação a 28°C até a esporulação. Os esporos foram coletados com auxílio de alça de Drigalski em 3,0 mL de solução de Tween 80 0,01% (v/v), esterilizada por filtração. A suspensão de esporos obtida foi lavada duas vezes com água destilada estéril por centrifugação (3000 x g durante 10 minutos). Os esporos foram ressuspensos em água destilada estéril e contados em câmara de Neubauer. Foi testada a presença de contaminantes nas suspensões, retirando-se 10 µl das mesmas e colocando-as em um tubo de ensaio contendo 3 mL de meio LB líquido (1% de triptona; 5% de extrato de levedura; 1% de NaCl (p/v)). Suspensões novas contendo cerca de 10⁸ esporos m/L foram utilizadas para inóculo.

3.5. Cascas de frutas utilizadas

Foram utilizadas cascas de frutas oriundas de supermercado, com exceção da casca de uva, coletada na Vinícola Aurora (Bento Gonçalves, RS). As cascas foram secas em estufa a 50°C para desidratação e, na hora do uso, trituradas.

3.6. Cultivo de *P. oxalicum*

P. oxalicum foi cultivado a partir de um inóculo de 10⁶ esporos/mL em 20 mL de meio Souza (item 3.1). Os frascos foram incubados em agitador orbital 170rpm a 28°C até 120h.

3.7. Ensaio enzimáticos:

3.7.1. Poligalacturonase (PG)

A atividade enzimática de PG, foi determinada pela análise da liberação de açúcares redutores, seguindo a metodologia de MILLER (1959). A 0,9 mL de uma solução 0,1% ácido poligalacturônico (SPECTRUM) em 0,1 M tampão acetato pH 5,0, foi adicionado 0,1 mL da enzima. O ensaio foi realizado por 30 minutos a 37°C. Transcorrido este tempo, adicionou-se 1mL de ácido dinitrosalicílico (DNS). As amostras foram fervidas 5 minutos e a leitura feita em 550 nm. Ácido galacturônico (5 mg/mL) (SIGMA) foi utilizado para a curva padrão. Para o branco da amostra, adicionou-se 1 mL de DNS antes da incubação a 37°C. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1

μmol de grupos redutores por minuto. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

3.7.2 Pectina liase (PL)

A atividade de PL foi determinada espectrofotometricamente pela medida do aumento da absorvância em 235 nm, conforme descrito por ALBERSHEIM E KILLIAS (1962). A mistura da reação (1 mL) continha 0,9 mL de 0,1% pectina cítrica (SIGMA) em 0,1 M tampão acetato pH 5,0 e 0,1 mL do preparado enzimático. O ensaio foi realizado por 30 minutos a 37°C. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de uronideo insaturado ($\epsilon = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por min. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

3.7.3 Pectinesterase (PE)

A metodologia utilizada foi modificada de BARNBY *et al.* (1990). A 2 mL de uma solução 1% pectina (SIGMA) em 0,1 M NaCl pH 7,5 foi adicionado 0,1 mL da enzima. O pH foi mantido por 30 minutos com a adição de 0,02 M NaOH. Uma unidade de PE foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 miliequivalente de grupos carboxil por mL por minuto. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

3.8. Quantificação de proteínas totais

A medida de proteínas totais foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA - PROTEIN ASSAY, PIERCE), utilizando albumina sérica bovina como padrão (SMITH *et al.*, 1985).

3.9. Otimização das condições de produção de pectinases de *P. oxalicum*

Foi realizada a otimização da produção de três pectinases de *P. oxalicum*: poligalacturonase (PG), pectina liase (PL) e pectinesterase (PE). Cada enzima foi analisada em separado, gerando três meios de cultivo otimizados diferentes.

3.9.1. Cultivo de *P. oxalicum* em meio líquido com diferentes fontes de carbono

O fungo foi cultivado a partir de um inóculo de 10^6 esporos/mL em 20 mL de meio Souza (item 3.1.), alterando a fonte de carbono. Foram utilizados: pectina cítrica 1% (Farmos, SP, Brasil), glicose 1%, glicose 0,5% + pectina cítrica 0,5%, ácido galacturônico 1%, casca de uva 1%, casca de laranja 1%, casca de maracujá 1% e casca de limão 1% (p/v). Os frascos foram incubados em agitador orbital 170rpm a 28⁰C até 96h. Após o crescimento, o sobrenadante foi utilizado para ensaios enzimáticos e o micélio coletado foi utilizado para determinação da biomassa por secagem em estufa a 80⁰C até estabilização do peso.

3.9.2. Cultivo de *P. oxalicum* em meio líquido com diferentes concentrações da fonte de carbono selecionada

P. oxalicum foi cultivado conforme descrito anteriormente (item 3.6) por 96h. A fonte de carbono selecionada para a produção de cada enzima (poligalacturonase, pectina liase e pectinesterase) foi testada em quatro diferentes concentrações: 0,5, 1, 2 e 3% (p/v).

3.9.3. Cultivo de *P. oxalicum* em diferentes pH

P. oxalicum foi cultivado conforme descrito anteriormente em meio Souza (item 3.6), com a fonte de carbono selecionada, bem como sua concentração. O pH inicial foi ajustado com tampão citrato-fosfato 50 mM para valores entre 3,0 e 7,0 e com tampão fosfato 50 mM para o valor de pH 8,0. Para o controle, foi utilizado o meio Souza sem tamponamento.

3.9.4. Cultivo de *P. oxalicum* em diferentes temperaturas

O fungo foi cultivado em meio Souza com fonte de carbono, concentração da mesma e pH selecionados em três temperaturas diferentes: 28⁰C, 32⁰C e 36⁰C, sendo que a primeira temperatura foi considerada como controle.

3.10. Caracterização dos preparados pectinolíticos

Após a otimização dos meios de cultivo para a produção das três enzimas testadas neste trabalho (PG, PE e PL), foi realizada a caracterização dos preparados enzimáticos.

Obs.: a caracterização de cada uma das enzimas foi feita em preparados individuais.

3.10.1. Influência do pH sobre a atividade enzimática

As atividades de PG, PL e PE dos preparados enzimáticos otimizados foram testadas em uma faixa de pH compreendida entre 3,0 a 10,0. Os tampões utilizados foram: ácido cítrico/fosfato de sódio para pH de 3,0 a 6,0; Tris-HCl para pH de 7,0 a 9,0 e carbonato/bicarbonato de sódio para pH 10,0, todos a uma concentração de 0,1 M. Para o controle, foi utilizado o ensaio padrão. Os substratos utilizados foram ácido poligalacturônico para PG e pectina cítrica para PL e PE, com ensaios realizados em triplicata.

3.10.2. Influência da temperatura sobre a atividade enzimática

Para o teste de temperatura ótima das enzimas, os ensaios enzimáticos de cada uma foram realizados em diferentes temperaturas, variando de 20 a 90⁰C, sendo o controle realizado a 37⁰C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.10.3. Efeito de detergentes

Os sobrenadantes dos preparados enzimáticos foram incubados por 10 min a 37⁰C com os seguintes detergentes: SDS, Tween 20, Tween 80 e Triton x-100, em duas concentrações: 1 e 5 mM. Após a incubação, as reações foram iniciadas com a adição dos substratos respectivos para as três enzimas: ácido poligalacturônico para PG e pectina cítrica para PL e PE. Todos os ensaios foram

realizados em triplicata. O resultado está apresentado como % de atividade residual relativa ao controle sem detergente.

3.10.4. Efeito de aditivos e agente redutor

Os sobrenadantes dos preparados enzimáticos foram incubados por 10min a 37⁰C com os aditivos PEG (polietilenoglicol) 6000 e glicerol, e o agente redutor β-mercaptoetanol, nas concentrações de 0,1 e 0,5%. Após incubação, as reações foram iniciadas com a adição do substrato respectivo para cada enzima. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados estão apresentados como % de atividade residual relativa ao controle.

3.10.5. Efeito de cátions e agente quelante

Os sobrenadantes dos preparados enzimáticos foram incubados por 10 min a 37⁰C com os seguintes cátions: zinco (ZnCl₂), cobre (CuCl₂), magnésio (MgCl₂), manganês (MnCl₂), césio (CsCl₂), cálcio (CaCl₂) e cobalto (CoCl₂) nas concentrações de 1 e 5 mM. Foi testado também o efeito do agente quelante, EDTA, sobre a atividade das enzimas em seus respectivos preparados, nas concentrações de 1 e 5 mM. Após incubação, as reações foram iniciadas com a adição do respectivo substrato de cada enzima. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.11. Aplicação dos preparados enzimáticos para extração de sucos

Os preparados enzimáticos obtidos através da otimização dos meios de cultivo para as três enzimas foram utilizados para o teste de aplicação dos mesmos na extração de sucos de frutas. Foram utilizadas as seguintes frutas: uva (variedade niágara), laranja (variedade valência) e maçã (variedade gala). A metodologia de extração foi otimizada, seguindo KASHYAP *et al.* (2001) (Figura 5). As frutas foram selecionadas, lavadas, picadas (laranja e maçã) ou esmagadas (uva) e misturadas. Uvas esmagadas foram aquecidas a 50^oC por 15 min e maçãs picadas foram mantidas por 15 min em contato com oxigênio para destruição de polifenóis que poderiam inibir a ação das pectinases (KASHYAP *et al.*, 2001). As frutas picadas e misturadas foram separadas em frascos com 20g cada. A cada frasco foi adicionado um preparado enzimático contendo 1 ou 10U/g de fruta de cada enzima. Os preparados foram diluídos em 20 mM tampão acetato pH 5,0 até um volume que cobrisse as frutas contidas nos frascos (aproximadamente 10 mL). Ao controle foi adicionado somente tampão. Os frascos foram mantidos por 6h a 37^oC com agitação. Após este tempo, foi procedida a extração dos sucos através de filtração em papel Whatman n. 1 e análise dos mesmos.

3.12. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Tuckey ($\alpha= 0,05$) através do programa SPSS 10.0 for Windows. Os resultados foram apresentados colocando-se letras ao lado das médias. Letras iguais indicam médias que não diferem significativamente.

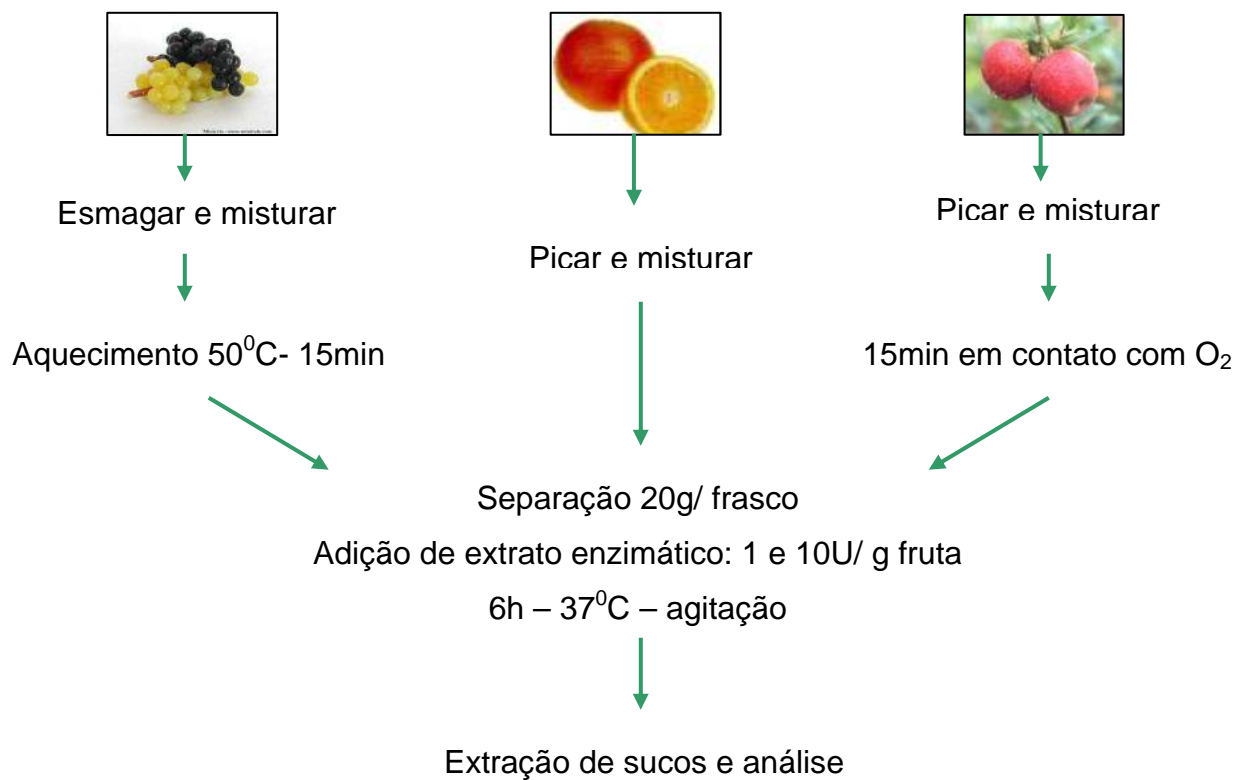


Figura 5- Metodologia desenvolvida para o ensaio de aplicação dos preparados pectinolíticos produzidos por *P. oxalicum*.

4. RESULTADOS

4.1 Seleção de microrganismos produtores de pectinases e teste de micotoxinas

Fungos filamentosos provenientes do Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica – UFRGS e alguns isolados de fontes ricas em pectina, como casca de uva e laranja, foram testados para detecção de pectinases através do halo de degradação em placa contendo pectina (item 3.2) (Figura 6).

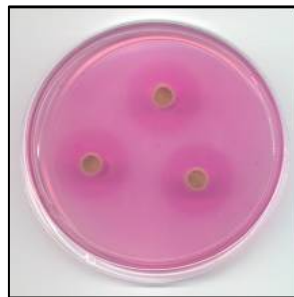


Figura 6- Teste em placa para seleção de microrganismos produtores de pectinases. Fotografia de placa mostrando o halo de degradação gerado pelo fungo *P. oxalicum*. A uma placa contendo meio Souza, foram adicionados três pedaços de uma cultura de *P. oxalicum* cultivado no mesmo meio por 72h. Após 24h, a placa foi coberta com vermelho de rutênio 0,02% para visualização do halo de degradação (translúcido).

A Tabela 3 mostra os microrganismos testados, bem como o tamanho do halo de degradação formado. Os três fungos que apresentaram o maior halo, *A. niger*, *A. japonicus* e *P. oxalicum*, foram selecionados para teste em cultivo em meio líquido.

Tabela 3- Microrganismos testados para a produção de pectinases.

Microrganismo	Origem	Halo (cm)
<i>A. niger</i> *	UFRGS	1,8
<i>A. flavus</i>	UFRGS	1,6
<i>A. awamori</i>	Casca de laranja	1,4
<i>A. japonicus</i> *	Casca de laranja	1,7
<i>P. restrictum</i>	UFRGS	0
<i>P. oxalicum</i> *	Casca de laranja	2,0
<i>P. gorgonzolla</i>	UFRGS	0
<i>T. harzianum</i>	UFRGS	0
<i>T. reesei</i>	UFRGS	0
<i>T. koningii</i>	UFRGS	0
<i>Aspergillus</i> sp. 29	UFRGS	1,0
<i>Aspergillus</i> sp. 34	UFRGS	1,3
Isolado U1	Casca de uva	0

* fungos selecionados

UFRGS- laboratório de fungos de importância médica e biotecnológica.

Os fungos filamentosos foram inoculados em placas contendo meio Souza com pectina. Após 72h, pedaços de 0,5 cm foram recortados e colocados sobre placa nova contendo o mesmo meio. Passada 24h, adicionou-se vermelho de rutênio para visualização do halo de degradação, que foi medido.

Estes microrganismos selecionados foram cultivados em meio Souza (item 3.1) com pectina cítrica como fonte indutora por 120h a 28^oC, 170rpm. Após este tempo, foi realizado um ensaio para detecção de atividade de pectinases totais, com modificação do ensaio para poligalacturonase (item 3.7.1), utilizando pectina cítrica 0,1% como substrato.

A partir deste experimento, foi selecionado o fungo *P. oxalicum*, por apresentar a maior atividade de pectinases totais (Figura 7A). Este fungo foi cultivado novamente em meio Souza contendo pectina cítrica 1% por 120h a 28^oC e agitação (170rpm). Foram retiradas alíquotas a cada 12h para ensaios de poligalaturonase, pectina liase e pectinesterase (itens 3.7.1, 3.7.2 e 3.7.3, respectivamente). Pode-se observar que houve um pico de atividade para as três enzimas em 96h de cultivo (Figura 7B).

Estes três microrganismos, juntamente com *Aspergillus* sp. n^o 29 e 34 (Tabela 3) foram analisados quanto à produção e secreção de micotoxinas (item 3.3). Para estes fungos, não houve a detecção de nenhuma micotoxina testada (dados não mostrados).

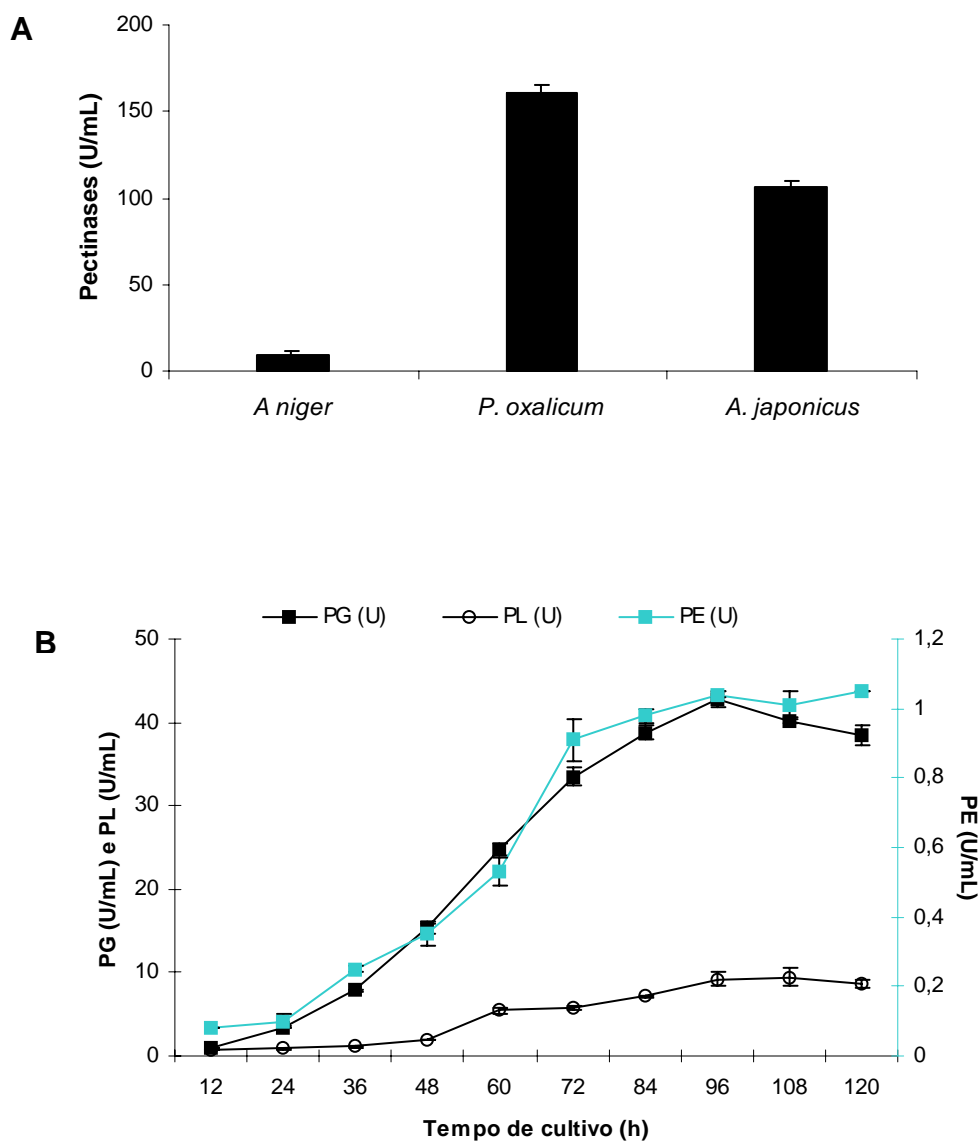


Figura 7- Produção de pectinases em meio líquido dos microrganismos selecionados. (A) *A. niger*, *A. japonicus* e *P. oxalicum* foram cultivados por 120h em meio Souza para detecção de pectinases totais; **(B)** cultivo de *P. oxalicum* em meio Souza com pectina cítrica 1% por 120h, com retirada de alíquotas a cada 12h, que foram analisadas quanto à atividade de poligalacturonase (PG), pectina liase (PL) e pectinesterase (PE).

4.2. Otimização da produção de pectinases utilizando resíduos agroindustriais

P. oxalicum foi selecionado como sendo um produtor promissor de pectinases. Visando otimizar o meio de produção destas enzimas, utilizamos fontes alternativas de pectina, como cascas de frutas, o que acarretaria em uma diminuição nos custos de produção.

4.2.1. Fontes de carbono

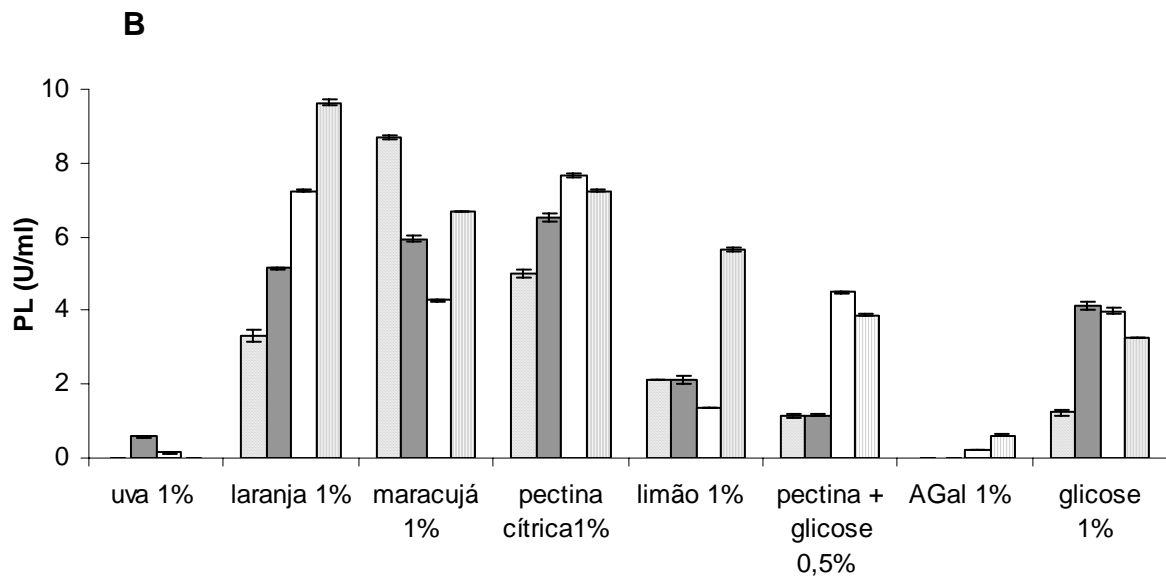
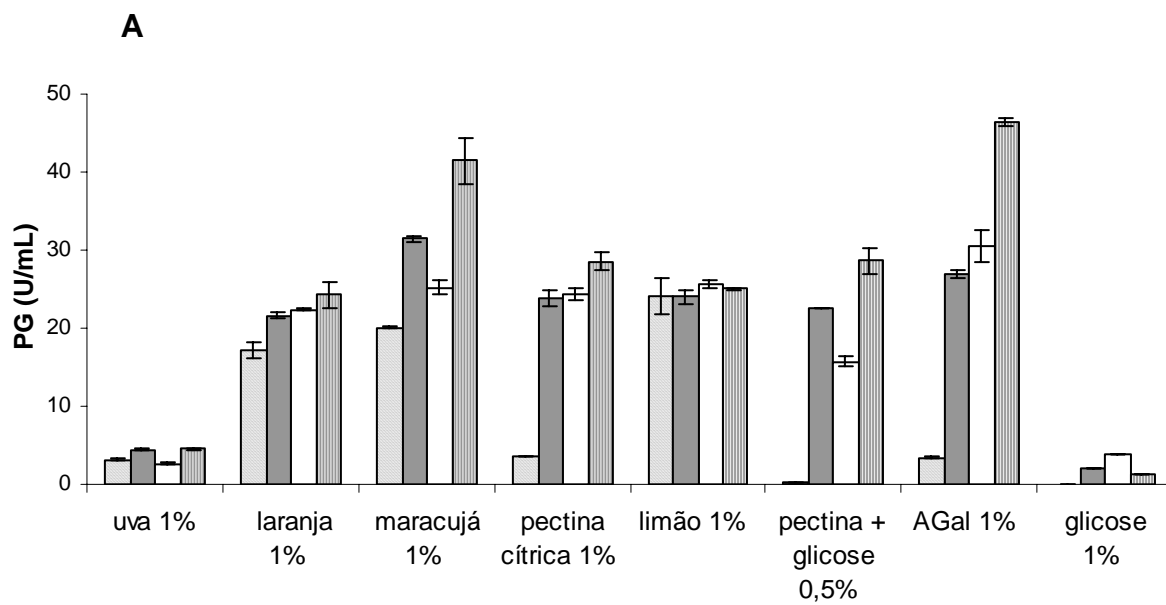
O fungo foi cultivado em meio Souza com diferentes fontes de energia, incluindo cascas de uva, laranja, maracujá e limão, além de glicose, ácido galacturônico e pectina cítrica como padrão, por 96h a 28⁰C e agitação (170rpm).

A Figura 8 mostra o perfil de produção de PG, PL e PE em meios contendo as diferentes fontes de carbono. A produção de PG alcançou valores máximos com ácido galacturônico ($46,52 \pm 0,52 \text{ U.mL}^{-1}$) e casca de maracujá ($41,46 \pm 2,95 \text{ U.mL}^{-1}$) em 96h de cultivo (Figura 8A e Tabela 4). Observa-se também que casca de uva ($4,57 \pm 0,21 \text{ U.mL}^{-1}$) não induziu a produção, provavelmente devido ao baixo conteúdo de pectina presente nesta fonte. A produção de PG foi fortemente reprimida quando glicose 1% foi adicionada ao meio de cultivo ($1,28 \pm 0,05 \text{ U.mL}^{-1}$). Porém, quando glicose (0,5%) foi adicionada ao meio juntamente com pectina (0,5%), a produção de PG foi menos afetada ($28,64 \pm 1,60 \text{ U.mL}^{-1}$).

Para a produção de PL, a atividade máxima foi alcançada com casca de laranja ($9,59 \pm 0,07 \text{ U.mL}^{-1}$) após 96h de cultivo (Figura 8B). Casca de uva e ácido

galacturônico ($0,61 \pm 0,01 \text{ U.mL}^{-1}$) não promoveram a produção de PL, enquanto glicose 1% pareceu ter um efeito menos significativo ($3,27 \pm 0,02 \text{ U.mL}^{-1}$).

A Figura 8C mostra que a produção de PE por *P. oxalicum* alcançou a maior atividade em meio contendo casca de laranja 1% ($0,87 \pm 0,09 \text{ U.mL}^{-1}$) após 72h de cultura. Interessantemente, outros resultados que apresentaram alta atividade de PE foram os meios com fontes cítricas, como casca de limão ($0,68 \pm 0,02 \text{ U.mL}^{-1}$), pectina cítrica ($0,78 \pm 0,07 \text{ U.mL}^{-1}$) e pectina cítrica suplementada com glicose 0,5% ($0,67 \pm 0,05 \text{ U.mL}^{-1}$). Quando *P. oxalicum* foi crescido em meio contendo glicose 1%, a produção não foi afetada ($0,72 \pm 0,02 \text{ U.mL}^{-1}$), mantendo 83% da atividade, se comparada à casca de laranja.



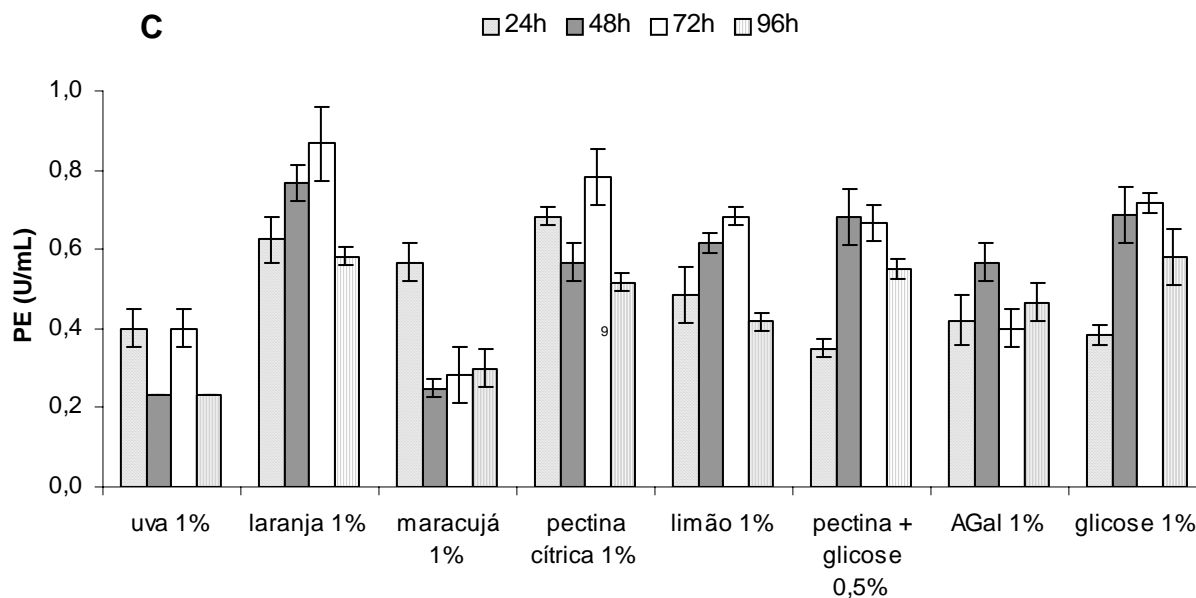


Figura 8- Atividade de pectinases secretadas por *P. oxalicum* cultivado em diferentes fontes de carbono. O fungo foi cultivado em meio Souza (96h, 28^oC, 170rpm), alterando a fonte de carbono com: casca de uva 1%, casca de laranja 1%, casca de maracujá 1%, casca de limão 1%, pectina cítrica 1%, pectina 0,5% + glicose 0,5%, glicose 1% e ácido galacturônico (AGal) 1%. **(A)** atividade de poligalacturonase (PG) com ácido poligalacturônico 0,1% como substrato; **(B)** atividade de pectina liase (PL) com pectina cítrica 0,1% como substrato; **(C)** atividade de pectinesterase (PE) com pectina cítrica 1% como substrato. Ensaio realizado em triplicata e os resultados representam a média aritmética.

Tabela 4- Atividade de pectinases secretadas por *P. oxalicum* cultivado em diferentes fontes de carbono.

Fonte de carbono	Atividade PG (U/mL.min ⁻¹)*	Atividade PL (U/mL.min ⁻¹)*	Atividade PE (U/mL.min ⁻¹)**	Proteína (mg.mL ⁻¹)
Casca uva	4,57 ± 0,21 ^a	0 ^a	0,4 ± 0,05 ^a	0,536
Casca laranja	24,24 ± 1,71 ^b	9,59 ± 0,07 ^h	0,87 ± 0,09 ^c	0,975
Casca Maracujá	41,46 ± 2,92 ^c	6,67 ± 0 ^f	0,28 ± 0,07 ^a	1,065
Pectina cítrica	28,55 ± 1,17 ^b	7,27 ± 0,03 ^g	0,78 ± 0,07 ^{bc}	0,398
Casca limão	25,08 ± 0,09 ^b	5,60 ± 0,08 ^e	0,68 ± 0,02 ^b	1,398
Pectina + glicose	28,64 ± 1,6 ^b	1,89 ± 0,01 ^c	0,67 ± 0,05 ^b	0,365
Ácido galacturônico	46,52 ± 0,52 ^c	0,61 ± 0,01 ^b	0,4 ± 0,05 ^a	0,68
Glicose	1,28 ± 0,05 ^a	3,27 ± 0,02 ^d	0,72 ± 0,02 ^b	0,884

* cultivo em 96h

** cultivo em 72h

a,b,c,d,e,f,g,h Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem significativamente segundo teste de Tuckey ($\alpha=0,05$)

A atividade de poligalacturonase (PG) foi determinada com ácido poligalacturônico 0,1% como substrato, a de pectina liase (PL) com pectina cítrica 0,1% como substrato e a atividade de pectinesterase (PE) com pectina cítrica 1% como substrato. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados representam a média aritmética ± desvio padrão.

Baseado nos resultados da Tabela 4, casca de laranja 1% foi selecionada como fonte de carbono para a continuação dos experimentos de otimização das condições de produção para as enzimas PL e PE. Para PG, como observado na Tabela 4, ácido galacturônico e casca de maracujá não diferem significativamente. Portanto, como é de interesse diminuir custos, casca de maracujá foi selecionada para a produção desta enzima.

4.2.2. Concentração da fonte de carbono selecionada

Após a seleção da melhor fonte de carbono para a produção de cada enzima, foi realizado o teste de concentração desta fonte. Meios contendo casca de laranja e casca de maracujá foram testados nas concentrações de 0,5, 1, 2 e 3% (p/v).

A atividade de PG foi aumentada quando casca de maracujá foi usada na concentração de 3% em 72h de cultivo ($69,59 \pm 0,93 \text{ U.mL}^{-1}$), mantendo-se constante após este período ($70,55 \pm 0,65 \text{ U.mL}^{-1}$) (Figura 9A). A produção de PL foi estimulada quando casca de laranja foi utilizada a uma concentração de 1% em 96h de cultura ($9,59 \pm 0,07 \text{ U.mL}^{-1}$) (Figura 9B). Para PE, casca de laranja a uma concentração de 2% aumentou a produção até 72h de cultivo do fungo, ($2,93 \pm 0,09 \text{ U.mL}^{-1}$), diminuindo após este tempo (Figura 9C).

Para continuar a otimização do processo de produção de pectinases por *P. oxalicum*, casca de maracujá a uma concentração de 3% e 72h de incubação foram as condições selecionadas para PG; casca de laranja 1% e 96h de cultivo para PL; e, casca de laranja a uma concentração de 2% e 72h para PE.

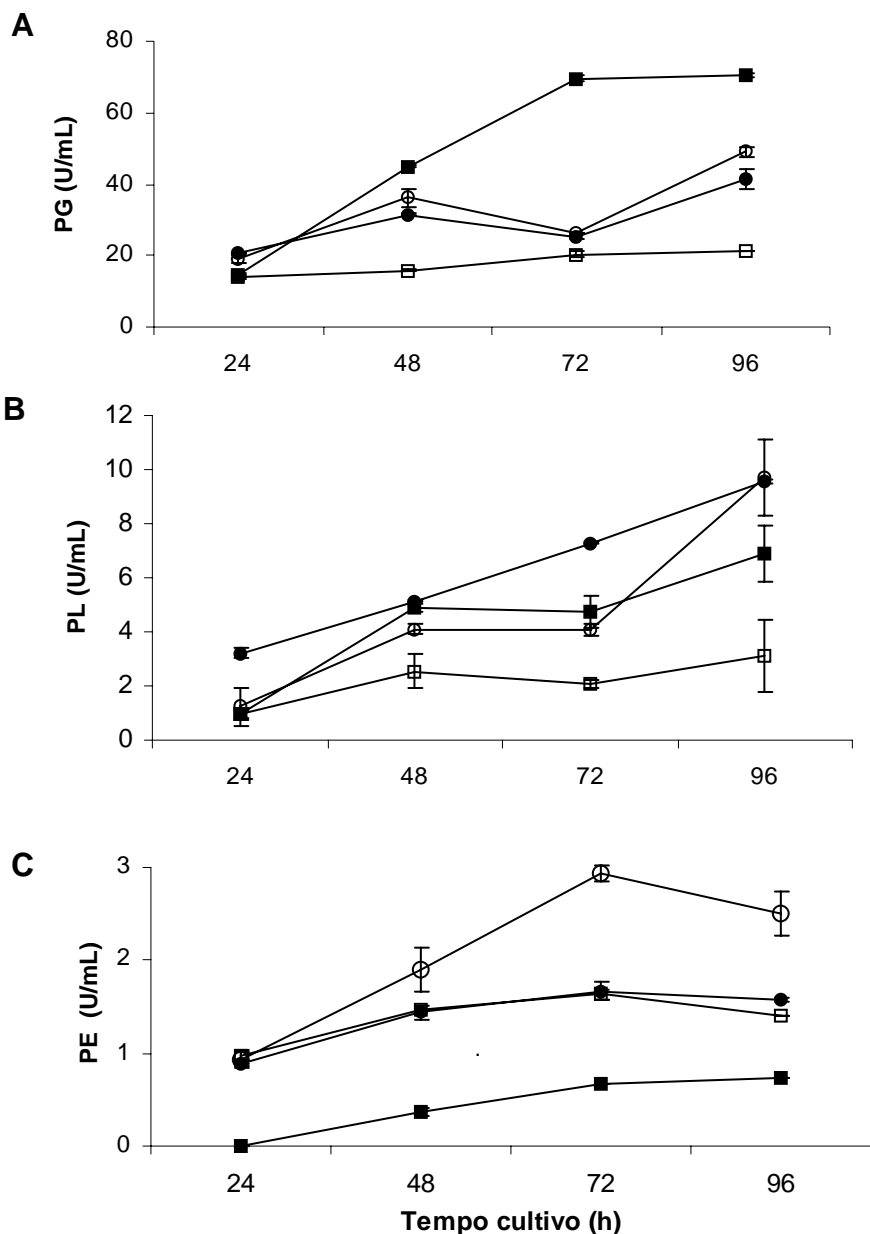


Figura 9- Efeito da concentração da fonte de carbono sobre a atividade de pectinases secretadas por *P. oxalicum*. O fungo foi cultivado em meio Souza (96h, 28^oC, 170rpm) contendo casca de laranja para PL e PE e casca de maracujá para PG, nas concentrações de 0,5% (□), 1% (●), 2% (○) e 3% (■). **(A)** atividade de poligalacturonase (PG); **(B)** atividade de pectina liase (PL); **(C)** atividade de pectinesterase (PE). Ensaio realizado em triplicata e os resultados representam a média aritmética.

4.2.3. Efeito do pH do meio de cultivo sobre a produção de pectinases de *P. oxalicum*

Após a seleção da fonte de carbono e a concentração da mesma, foi realizado o estudo do efeito do pH do meio de cultura sobre a produção de pectinases secretadas por *P. oxalicum*.

A atividade de PG foi maior no meio Souza contendo casca de maracujá 3% sem tamponamento (meio controle) ($60,87 \pm 1,56 \text{ U.mL}^{-1}$). Para PL, a maior atividade detectada foi observada no meio com casca de laranja 1% em pH 7,0 com 24h de cultivo ($37,66 \pm 0,4 \text{ U.mL}^{-1}$), declinando consideravelmente após este tempo. A atividade de PE foi maior no meio contendo casca de laranja 2% em 72h de cultivo e tamponado em pH 7,0 ($8,17 \pm 0,09 \text{ U.mL}^{-1}$), aumentando quase 3 vezes em relação ao controle (Tabela 5).

Tabela 5- Efeito do pH do meio sobre a produção de pectinases por *P. oxalicum*.

pH	Atividade PG (U/mL.min ⁻¹)*	Atividade PL (U/mL.min ⁻¹ **	Atividade PE (U/mL.min ⁻¹)*
Controle	60,87 ± 1,56 ^f	3,22 ± 0,16 ^a	2,93 ± 0,09 ^d
3,0	24,45 ± 1,37 ^{bc}	4,74 ± 0,36 ^b	1,97 ± 0,05 ^b
4,0	17,40 ± 0,5 ^a	7,99 ± 2,01 ^c	1,80 ± 0 ^b
5,0	32,87 ± 0,65 ^e	9,49 ± 0,1 ^d	2,67 ± 0 ^c
6,0	26,98 ± 0,82 ^{cd}	10,00 ± 0,1 ^d	2,80 ± 0 ^{cd}
7,0	29,50 ± 0,43 ^{de}	37,66 ± 0,4 ^e	8,07 ± 0,09 ^e
8,0	22,66 ± 0 ^b	10,14 ± 0,92 ^d	1,50 ± 0,05 ^a

* 72h cultivo

** 24h cultivo

a,b,c,d,e Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem significativamente segundo teste de Tuckey ($\alpha=0,05$)

controle: meio sem tamponamento, com pH inicial de 4,5.

O fungo foi cultivado em meio Souza contendo casca de laranja 1 e 2% para PL e PE, respectivamente, e casca de maracujá 3% para PG. O meio foi tamponado com diferentes pH, variando de 3,0 a 8,0. Ensaios realizados em triplicata e os resultados representam a média aritmética ± desvio padrão.

4.2.4. Efeito da temperatura sobre a produção de pectinases por *P. oxalicum*

A Tabela 6 mostra o efeito de diferentes temperaturas sobre a produção de PG, PL e PE por *P. oxalicum*. A temperatura ótima para a produção de PG foi 32°C ($80,22 \pm 0,04 \text{ U.mL}^{-1}$), enquanto para PL e PE a temperatura ótima de cultivo foi 28°C ($37,65 \pm 0,4 \text{ U.mL}^{-1}$ e $8,17 \pm 0,09 \text{ U.mL}^{-1}$, respectivamente). Para estas duas enzimas, a atividade decaiu consideravelmente nas outras temperaturas testadas (32°C e 36°C). Os meios de cultivo otimizados ficaram da seguinte forma:

- PG: casca de maracujá 3%, 32°C por 72h e meio sem tamponamento;
- PL: casca de laranja 1% pH 7,0, 28°C por 24h;
- PE: casca de laranja 2% pH 7,0, 28°C por 72h.

Tabela 6- Efeito da temperatura de cultivo sobre a produção de pectinases por *P. oxalicum*.

Temperatura	Atividade PG (U/mL.min ⁻¹)	Atividade PL (U/mL.min ⁻¹)	Atividade PE (U/mL.min ⁻¹)
28°C	$69,6 \pm 0,93^b$	$37,65 \pm 0,40^b$	$8,17 \pm 0,09^c$
32°C	$80,22 \pm 0,04^c$	0 ^a	$0,37 \pm 0,05^a$
36°C	$43,49 \pm 0,09^a$	$0,05 \pm 0,01^a$	$1,46 \pm 0,09^b$

a,b,c Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem significativamente segundo teste de Tuckey ($\alpha=0,05$)

O fungo foi cultivado em meio Souza contendo casca de laranja 1 e 2% pH 7,0 para PL e PE, respectivamente, e casca de maracujá 3% para PG. Ensaios realizados em triplicata e os resultados representam a média aritmética \pm desvio padrão.

4.3. Caracterização dos sobrenadantes (preparados enzimáticos) dos meios de cultivo otimizados para a produção de pectinases por *P. oxalicum*

Após a otimização do meio de cultivo para a produção de PG, PL e PE por *P. oxalicum*, os sobrenadantes, chamados de preparados enzimáticos, foram caracterizados quanto ao efeito do pH, temperatura, detergentes, aditivos, agente redutor, cátions e EDTA sobre a atividade das enzimas.

4.3.1. Influência do pH sobre a atividade das enzimas

O efeito do pH sobre a atividade das três pectinases utilizadas neste trabalho foi verificado utilizando-se ácido poligalacturônico como substrato para PG e pectina cítrica como substrato para PL e PE, com pH variando entre 3,0 a 10,0.

Para poligalacturonase, o pH parece não afetar a atividade da enzima presente no preparado enzimático otimizado, tendo uma atividade alta em todos os pHs testados. Porém, observa-se uma atividade mais pronunciada em pHs ácidos (Figura 10A). O perfil de atividade para pectina liase mostra uma atividade ótima em pH 6,0 para a enzima neste preparado (Figura 10B). Para pectinesterase, a atividade ótima da enzima no preparado foi em pH 9,0 (Figura 10C).

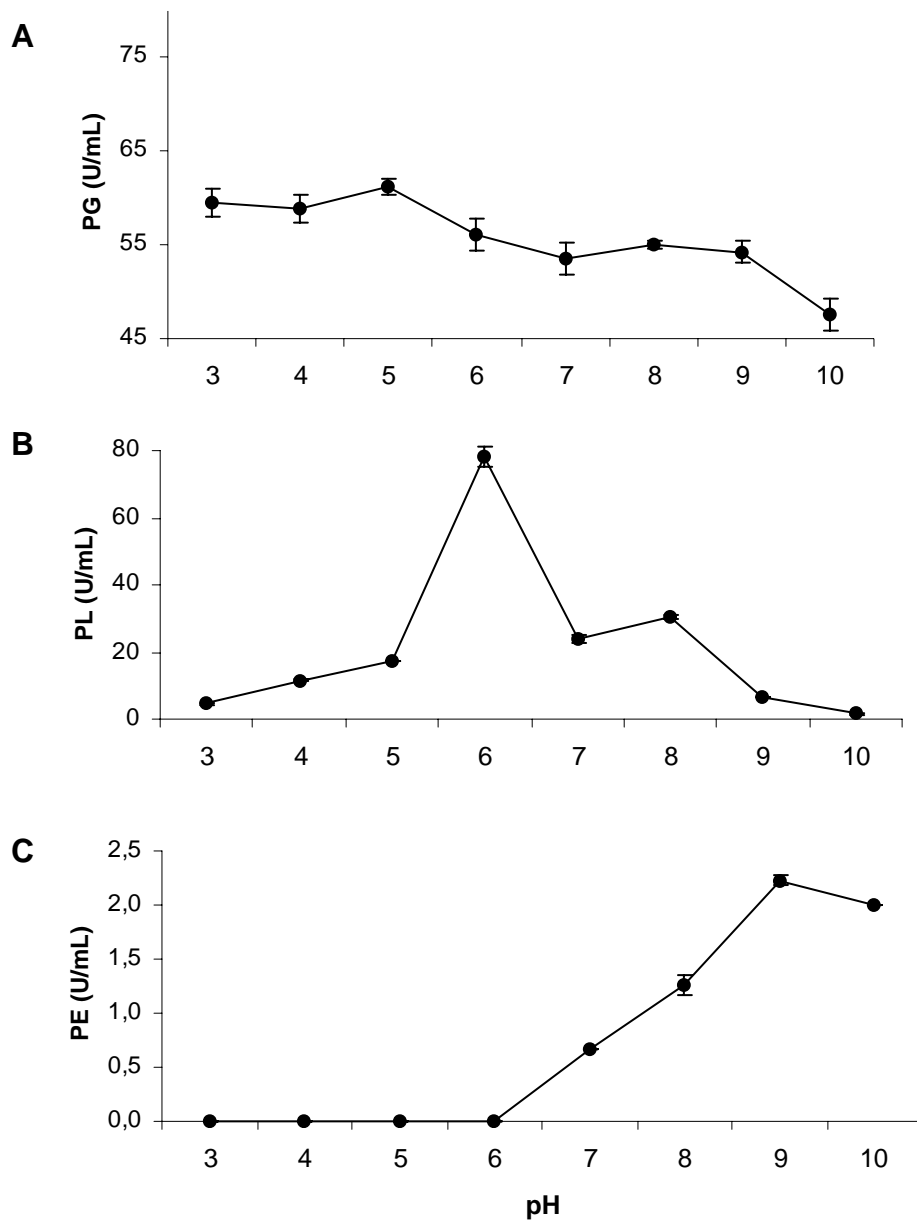


Figura 10- Influência do pH sobre a atividade das pectinases presentes nos sobrenadantes de cultivo de *P. oxalicum*. Os preparados enzimáticos otimizados para cada enzima foram ensaiados com os substratos de cada enzima - ácido poligalacturônico para PG e pectina cítrica para PL e PE - com pH variando entre 3,0 e 10,0 **(A)** poligalacturonase; **(B)** pectina liase e **(C)** pectinesterase. Ensaios realizados em triplicata.

4.3.2. Influência da temperatura sobre a atividade das enzimas

PG, PL e PE foram ensaiadas em diferentes temperaturas. PG presente no preparado enzimático otimizado apresentou atividade ótima entre 30 e 50^oC. PL e PE tiveram atividade ótima em 40^oC, conforme mostrado na Figura 11.

4.3.3. Efeito de detergentes

O efeito de diferentes detergentes sobre PG, PL e PE presentes nos preparados enzimáticos foi determinado, utilizando-se como substrato ácido poligalacturônico para PG e pectina cítrica para PL e PE. SDS teve o maior efeito inibitório para todas as enzimas em ambas concentrações testadas, com efeito mais pronunciado para PL e PG, levando a total inibição das mesmas. Para PE, o efeito foi menor, com redução de aproximadamente 30%. Tween 20, Tween 80 e Triton X-100 não tiveram efeito inibitório sobre a atividade de ambas as enzimas dos preparados na concentração de 1 mM e na concentração de 5 mM para PE. Estes detergentes pareceram auxiliar a ação das enzimas, aumentando suas atividades, especialmente para PG, onde o aumento foi de 50%. Porém, Triton X-100 na concentração de 5 mM, pareceu interferir na atividade das enzimas PG e PL significativamente, com redução de 60 e 70%, respectivamente (Tabela 7).

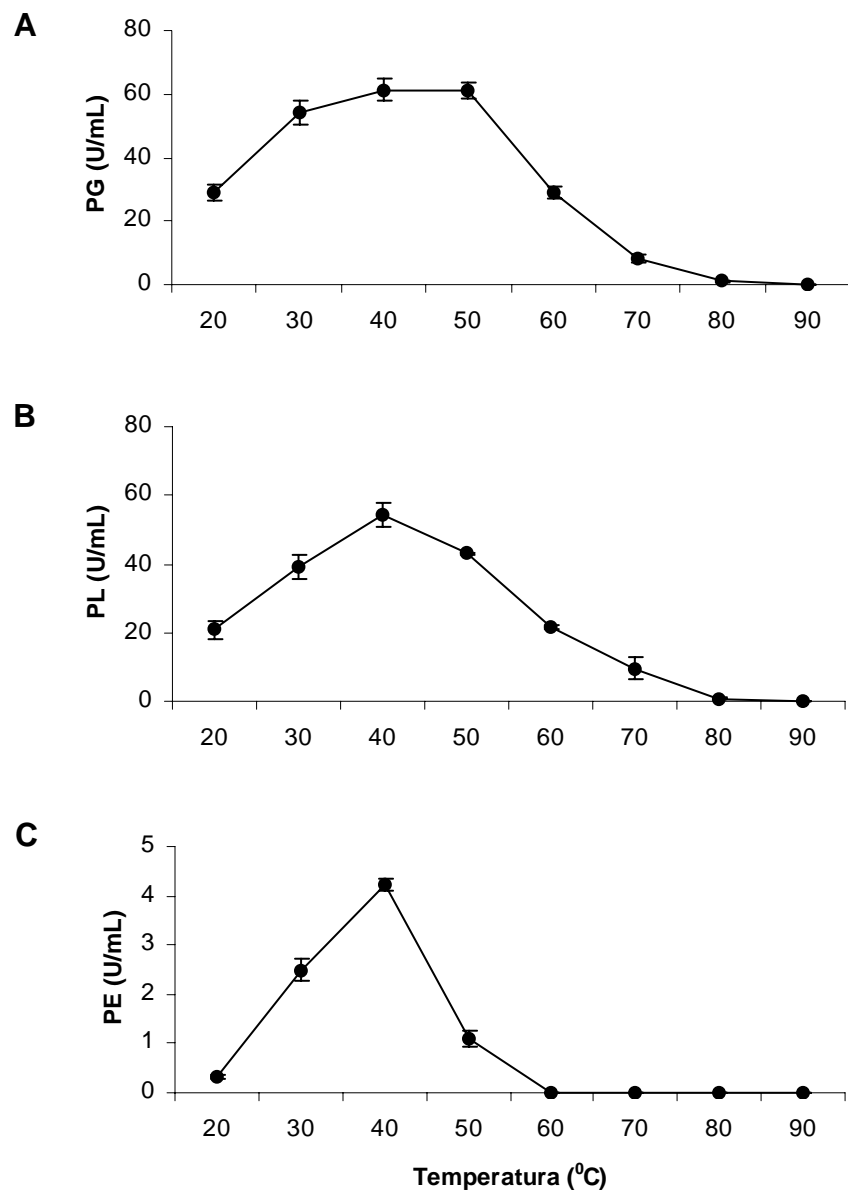


Figura 11- Influência da temperatura sobre a atividade das pectinases presentes nos sobrenadantes de cultivo de *P. oxalicum*. Os preparados enzimáticos otimizados para cada enzima foram ensaiadas com seus respectivos substratos - ácido poligalacturônico para PG e pectina cítrica para PL e PE - com temperatura variando entre 20 e 90°C. **(A)** poligalacturonase (PG); **(B)** pectina liase (PL) e **(C)** pectinesterase (PE). Ensaios realizados em triplicata.

Tabela 7- Efeito de detergentes sobre a atividade das pectinases presentes nos sobrenadantes de cultivo de *P. oxalicum*.

	Poligalacturonase		Pectina liase		Pectinesterase	
	1mM	5mM	1mM	5mM	1mM	5mM
C	100	100	100	100	100	100
SDS	4,60	0	0	0	69,76	65,12
Tween 20	153,31	76,73	96,02	85,35	143,20	130,24
Tween 80	146,17	77,14	102,76	93,24	120,77	117,71
Triton X-100	151,73	43,28	91,99	29,78	112,96	109,40

Os preparados enzimáticos otimizados para cada enzima foram incubados por 10min com os detergentes testados. O ensaio foi disparado com a adição dos respectivos substratos - ácido poligalacturônico para PG e pectina cítrica para PL e PE. Ensaios realizados em triplicata e os resultados estão apresentados como % de atividade residual relativa ao controle.

4.3.4. Efeito de aditivos e agente redutor

O efeito de aditivos e de um agente redutor sobre a atividade de PG, PL e PE presentes nos preparados enzimáticos foram analisados (Tabela 8). Para PG, os aditivos PEG 6000 e glicerol não tiveram efeito negativo quando utilizados na concentração de 0,1%. Porém, com o aumento da concentração, glicerol reduziu a atividade em torno de 30%. Para a enzima PL, ambos os reagentes interferiram de forma drástica na atividade enzimática, com uma redução de aproximadamente 100%. Para PE, os aditivos e o agente redutor tiveram um efeito inibitório sobre a enzima do preparado enzimático, com redução entre 20 e 30%.

Tabela 8- Efeito de aditivos e de agente redutor sobre a atividade das pectinases presentes nos sobrenadantes de cultivo de *P. oxalicum*.

	Poligalacturonase		Pectina liase		Pectinesterase	
	0,1%	0,5%	0,1%	0,5%	0,1%	0,5%
C	100	100	100	100	100	100
PEG 6000	100,53	96,84	1,38	1,37	88,12	88,12
glicerol	103,74	72,64	1,40	1,33	87,04	83,37
β -mercaptoetanol	51,90	42,18	1,18	0,15	88,12	87,80

Os preparados enzimáticos contendo as enzimas foram incubados por 10min com os aditivos e o agente redutor testados. O ensaio foi disparado com a adição dos respectivos substratos - ácido poligalacturônico para PG e pectina cítrica para PL e PE. Ensaios realizados em triplicata e os resultados estão apresentados como % de atividade residual relativa ao controle.

4.3.5. Efeito de cátions e EDTA

O efeito de diferentes cátions e EDTA sobre a atividade das pectinases PG, PL e PE presentes nos preparados enzimáticos foram analisados (Tabela 9). Para PG, Zn e Cu causaram uma redução significativa da atividade em torno de 60 a 70% nas duas concentrações testadas. Mn, Ca e Co também causaram efeito negativo, porém mais sutil, aproximadamente 10-20%. Os outros cátions testados, Mg e Cs, pareceram favorecer a atividade enzimática. Interessantemente, todos os cátions testados diminuíram (ou aumentaram) seu efeito quando testado na concentração de 5 mM.

Para a enzima PL, o cátion Cu teve o maior efeito inibitório, com redução da atividade em torno de 98%. Co também teve um efeito inibitório, porém mais sutil, entre 10 e 25% para 1 e 5 mM, respectivamente. Os outros cátions testados, praticamente não tiveram efeito inibitório ou indutor. Para PE, somente o cátion Cu teve efeito inibitório, com redução em torno de 40% para as duas concentrações testadas. Os outros cátions não tiveram efeito sobre a atividade desta enzima em seu respectivo preparado.

O efeito de EDTA também foi analisado para as três enzimas. A Tabela 9 mostra que este agente quelante não teve efeito sobre nenhuma das enzimas, sugerindo que elas não necessitam de cofatores para que exerçam sua atividade.

Tabela 9- Efeito de cátions e EDTA sobre a atividade das pectinases presentes nos sobrenadantes de cultivo de *P. oxalicum*.

	Poligalacturonase		Pectina liase		Pectinesterase	
	1mM	5mM	1mM	5mM	1mM	5mM
C	100	100	100	100	100	100
Zn	39,6	41,4	98,0	96,4	97,6	96,2
Cu	31,6	33,0	2,3	1,2	65,8	58,4
Mg	104,2	108,7	106,2	105,1	99,82	98,98
Mn	96,36	100,55	100,26	100,2	103,2	103
Cs	117,6	122,7	99,64	99,1	100,26	100,26
Ca	80,56	84,06	100,34	99,84	99,34	98,47
Co	87,36	91,15	88,25	76,87	92,46	92,12
EDTA	98,48	97,15	101,2	99,2	98,67	98,1

Os preparados enzimáticos contendo as enzimas foram incubados por 10min com os diferentes cátions testados e EDTA. O ensaio foi disparado com a adição dos respectivos substratos - ácido poligalacturônico para PG e pectina cítrica para PL e PE. Ensaios realizados em triplicata e os resultados estão apresentados como % de atividade residual relativa ao controle.

4.4. Aplicação dos preparados enzimáticos produzidos por *P. oxalicum* com atividade de pectinases na extração de sucos de frutas.

Os preparados enzimáticos obtidos através da otimização dos meios de cultivo para as três enzimas foram utilizados em um teste de aplicação dos mesmos na extração de sucos de frutas, conforme descrito anteriormente (item 3.11 e Figura 5). Foram utilizadas as seguintes frutas: uva (variedade niágara), laranja (variedade valência) e maçã (variedade gala).

A Figura 12 mostra os resultados obtidos neste experimento. Houve um aumento na extração de sucos para todas as frutas, com a adição de todos os preparados enzimáticos e nas duas concentrações testadas, com exceção de PG e PE na concentração de 1U para uva. Quando 10U das enzimas foram adicionadas, observou-se um aumento significativo na extração de sucos.

Para uva, foi observado também um aumento na extração de cor e diminuição da turbidez do suco para as três enzimas analisadas (Figura 12A). Para laranja, observa-se uma diminuição significativa da turbidez do suco quando adicionado PG 10U (Figura 12B). Já para maçã, observa-se claramente a extração de cor para as três enzimas testadas, bem como a diminuição da turbidez para PG e PL (Figura 12C).

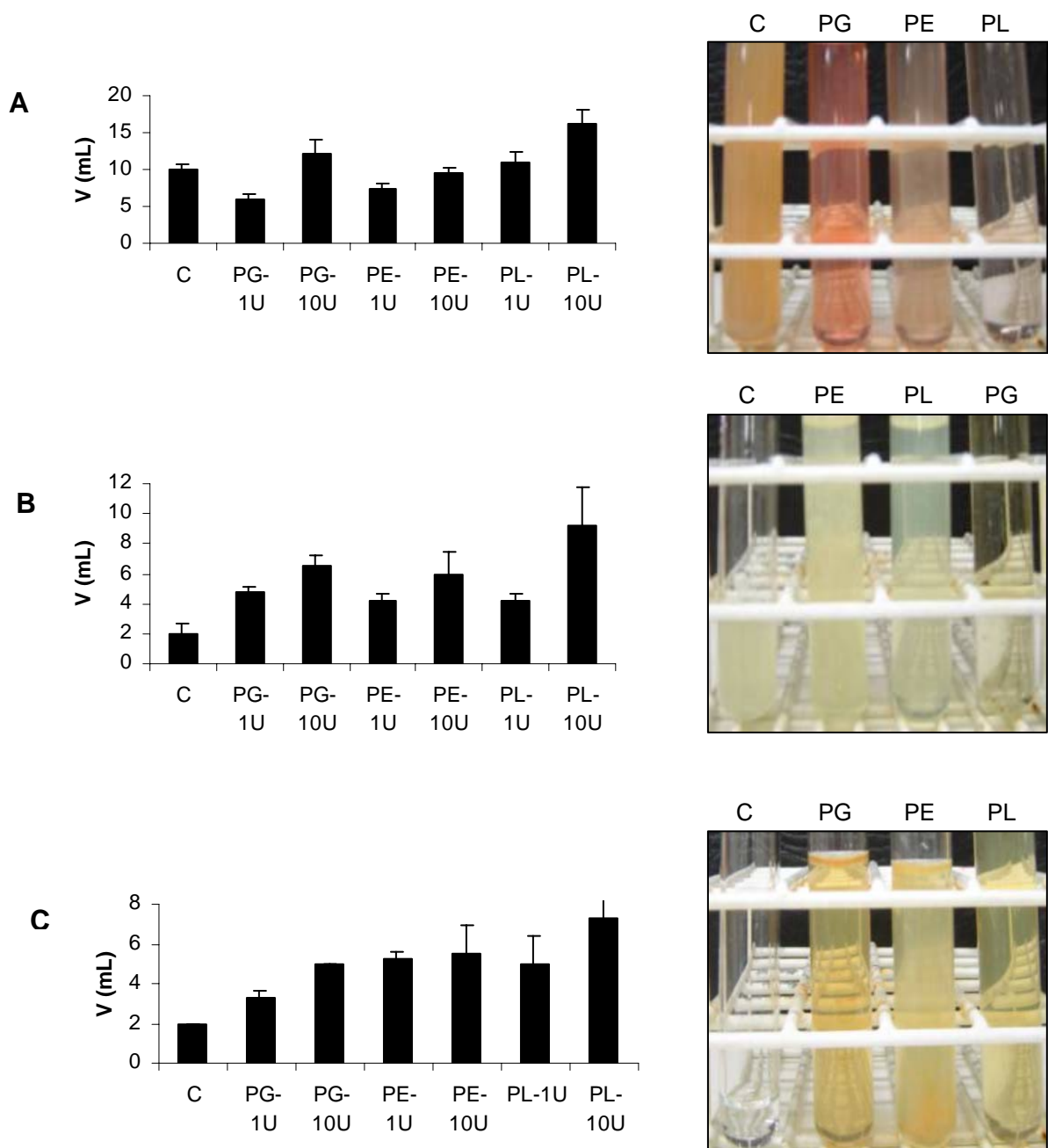


Figura 12- Aplicação dos preparados enzimáticos com atividade de pectinases produzidos por *P. oxalicum* na extração de sucos de frutas. (A) uva; (B) laranja; (C) maçã. Fotografia dos sucos utilizando 10U das enzimas: PG- poligalacturonase, PL- pectina liase, PE- pectinesterase. Os gráficos indicam o volume (mL) coletado após 6h de incubação. Ensaio realizado em triplicata e os valores indicam a média aritmética.

5. DISCUSSÃO

O mercado de pectinases responde por $\frac{1}{4}$ da movimentação mundial de enzimas, com estimativa de aumento no consumo para este ano (ALKORTA *et al.*, 1998; KASHYAP *et al.*, 2001). O Brasil produz, por ano, quantidades consideráveis de resíduos agroindustriais derivados do processamento de sucos que podem ser utilizados como fonte de carbono para a produção de pectinases em escala comercial.

Neste trabalho, realizamos a produção, a caracterização e a aplicação de preparados pectinolíticos produzidos pelo fungo *P. oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais. Detectamos, neste trabalho, a atividade de pectinesterase para este fungo, não detectada em um trabalho anterior (IKOTUN, 1984).

O cultivo do isolado *P. oxalicum* para produção de pectinases foi realizado pelo método submerso e aeróbico, similar à metodologia aplicada para os fungos *A. niger* (AGUILAR & HUITRON, 1987; BAILEY & PESSA, 1990), *P. expansum* (SILVA *et al.*, 1993), *Botrytis cinerea* (LEONE & VAN DER HEUVEL, 1987) e para a levedura *Kluyveromyces wickerhamii* (MOYO *et al.*, 2002), sendo esta metodologia de uso freqüente para a produção de pectinases. Porém, o método de fermentação semi-sólida também vem sendo utilizado para a produção destas enzimas (PASTOR *et al.*, 2002; KASHYAP *et al.*, 2003; FONTANA *et al.*, 2005).

A produção de pectinases é fortemente influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, bem como pH e temperatura da cultura (AGUILAR & HUITRON, 1987; FAWOLE & ODUNFA, 2003; OLSSON *et*

al., 2003) e pela presença de substâncias pécticas, incluindo cascas de frutas (AGUILAR & HUITRON, 1987; ISMAIL, 1996; CROTTI *et al.*, 1999).

O fungo *P. oxalicum* foi selecionado como o melhor produtor de pectinases, tendo a produção destas enzimas alcançado valores máximos em 4 dias de cultivo. Quando utilizamos diferentes fontes de carbono para a produção de poligalaturonase (PG), observamos maior atividade em meio contendo casca de maracujá 1% e ácido galacturônico 1%. Este composto, por ser o monômero da pectina, poderia atuar reprimindo a produção por repressão catabólica, o que não foi observado. Esta falta de repressão sugere que a produção de PG por *P. oxalicum* pode ser constitutiva, conforme demonstrado para *Aspergillus* sp. (AGUILAR & HUITRON, 1990) e *K. wickerhamii* (MOYO *et al.*, 2002). Esta falta de repressão pode também sugerir que o ácido galacturônico, na concentração utilizada, poderia atuar como indutor, conforme descrito para *Aspergillus* sp. (AGUILAR & HUITRON, 1987).

A produção de PG foi fortemente inibida por glicose 1%, sugerindo repressão catabólica, assim como detectado para o fungo *A. japonicus*. (TEIXEIRA *et al.*, 2000). Porém, houve um aumento da atividade da enzima quando a glicose foi utilizada na concentração de 0,5% juntamente com pectina 0,5%. Foi observada repressão da atividade somente nas primeiras 24h, sugerindo que a glicose tenha sido consumida durante este período, resultando na síntese de PG induzida pela presença de pectina no meio, o que disponibilizaria ácido galacturônico para nutrição do fungo. Resultados similares foram detectados para *K. wickerhamii* (MOYO *et al.*, 2002) e *Saccharomyces fragilis* (WINBORNE & RICHARD, 1978).

Para a produção de pectina liase (PL), casca de uva e ácido galacturônico não promoveram a produção desta enzima, sugerindo repressão catabólica pelo monômero da pectina, assim como relatado para *P. griseoroseum* (BRUMANO *et al.*, 1991).

Atividades menores de pectinesterase (PE) foram encontradas no meio contendo casca de uva e de maracujá. Uma indução menor, comparada à casca de laranja, verificada quando estas fontes estavam presentes no meio, poderia ocorrer devido à forma da pectina presente nestas cascas não ser altamente esterificada (substrato preferencial da PE). Quando o fungo foi cultivado no meio contendo glicose (1%), a produção não foi afetada, mantendo 83% da atividade alcançada com casca de laranja. Este resultado sugere que a síntese de PE por *P. oxalicum* pode ser constitutiva, diferentemente do que foi reportado para *A. niger* (MALDONADO *et al.*, 1998).

Foi observado também que casca de uva não induziu níveis altos de atividade para PG e PL. O conteúdo de pectina presente na uva é baixo. Além disso, apresenta naturalmente leveduras em sua casca que poderiam ter degradado a pectina para nutrição celular, diminuindo ainda mais a quantidade do substrato e ocasionando uma inibição da produção destas pectinases por *P. oxalicum*.

Tendo selecionado a melhor fonte de carbono para a produção de pectinases por *P. oxalicum*, foi realizado o teste de concentração da mesma, sendo selecionadas casca de maracujá a uma concentração de 3% e 72h de cultivo para PG, casca de laranja 1% e 96h de cultivo para PL e casca de laranja a uma concentração de 2% e 72h para PE. Assim como LEONE & VAN DER

HEUVEL (1987), NAIR *et al.* (1995) e TEIXEIRA *et al.* (2000), estes resultados sugerem que as diferentes pectinases produzidas são afetadas pelo tipo e concentração do substrato presente no meio de cultivo.

Quando realizamos a otimização do pH do meio de cultivo para a produção de pectinases por *P. oxalicum*, verificamos que, para PG, alta atividade foi detectada no meio sem tamponamento, que apresenta pH inicial de 4,5. Para *A. niger*, pH ácidos também foram detectados (BAILEY & PESSA, 1990; FAWOLE & ODUNFA, 2003). Para PL, foi detectada uma grande produção em pH 7,0 com 24h de cultivo. Este requerimento de pH neutro ou alcalino para a produção de PL já foi demonstrado para outros microrganismos (MANACHINI *et al.*, 1988; SILVA *et al.*, 1993).

A temperatura ótima para produção de PG foi 32⁰C, enquanto para PL e PE foi 28⁰C. Existem variações de temperaturas ótimas para a produção de pectinases por diferentes fungos (AGUILAR E HUITRON, 1987; HOURS *et al.*, 1988; FAWOLE & ODUNFA, 2003; SOUZA *et al.*, 2003).

Após a otimização das condições de produção para cada uma das pectinases testadas, foi realizada a caracterização dos sobrenadantes de cultivo, denominados preparados enzimáticos, produzidos por *P. oxalicum*. Foram analisadas propriedades como temperatura e pH ótimo das enzimas e efeito de detergentes, aditivos, agente redutor, cátions e EDTA.

O preparado enzimático otimizado para PG apresentou um pH ótimo entre 3,0 e 5,0. Porém, foi detectada atividade elevada em todos os pH testados, entre 3,0 e 10,0, sugerindo que possa haver mais de uma PG secretada e que estas tenham atividade ótima em diferentes pH ou que a(s) PG(s) secretada(s) tenham

estabilidade em uma ampla faixa de pH. De acordo com IKOTUN (1984), *P. oxalicum* produz duas PGs. O pH ótimo para PGs fúngicas é ácido, incluindo preparações comerciais (BAILEY & PESSA, 1990; DOS *et al.*, 2002). Este resultado é bastante interessante, uma vez que o preparado enzimático otimizado para *P. oxalicum* apresenta atividade de PG em pH alcalino, importante para aplicações industriais que requerem condições mais alcalinas, como no tratamento de vegetais e fibras naturais (HOONDAL *et al.*, 2002). Para o preparado otimizado para a enzima PL, foi detectada a maior atividade em pH 6,0, estando de acordo com WHITAKER (1984), com culturas de *A. niger* (ZETELAKI-HORVÁTH, 1982) e *P. italicum* (ALANÑA *et al.*, 1990). Para PE, a atividade maior foi detectada em pH 9,0, diferindo da PE encontrada para o isolado *A. oryzae* A-3, com pH 5,5 (UEDA *et al.*, 1982). Este resultado também é interessante para aplicação industrial que requer condições mais alcalinas.

A temperatura ótima encontrada para as enzimas presentes nos preparados enzimáticos foi: 30-50⁰C para PG e 40⁰C para PL e PE. Resultados similares foram encontrados para PL do fungo endofítico *Paenibacillus amylolyticus* (SAKIYAMA *et al.*, 2001), de *Aureobasidium pullulans* (MANACHINI *et al.*, 1988) e *P. expansum* (SILVA *et al.*, 1993); para PG de *A. niger* (BAILEY & PESSA, 1990), de *P. frequentans* (BORIN *et al.*, 1996) e de *Sporotrichum thermophile* (KAUR *et al.*, 2004); e para PE de *A. aculeatus* (CHRISTGAU *et al.*, 1996). A atividade em temperaturas altas, como as obtidas para as três enzimas em seus respectivos preparados é uma propriedade desejável, especialmente para a aplicação em indústrias de processamento de frutas, como clarificação de suco de maçã (KASHYAP *et al.*, 2001; FAWOLE & ODUNFA, 2003).

O efeito de detergentes sobre a atividade de PG, PL e PE de *P. oxalicum* foi analisado. Os detergentes foram testados porque podem ser adicionados nas formulações de detergentes usados na indústria têxtil. A total perda de atividade de PG foi detectada na presença de SDS, detergente iônico com caráter desnaturante, sugerindo que interações iônicas são importantes para a estabilidade da enzima. A enzima foi inibida por Triton X-100, Tween 20 e Tween 80 na concentração de 5 mM. Resultados similares foram encontrados para o fungo *S. thermophile* (KAUR *et al.*, 2004). SDS causou a total inibição da atividade de PL, podendo estar interferindo na estrutura da enzima, desestruturando interações iônicas, assim como relatado para PG. Apenas SDS inibiu a atividade enzimática de PE, entre 30 e 40%, sendo esta inibição menor, se comparada aos dois outros preparados analisados. Os outros detergentes tiveram efeito indutor para esta enzima nas duas concentrações testadas. Esta propriedade é importante, para uma futura aplicação comercial, já que estes detergentes poderiam ser adicionados à formulação para aumentar a atividade da enzima.

A atividade de PG e PL foi inibida por β -mercaptoetanol nas duas concentrações testadas, com redução de 50 e 99%, respectivamente, sugerindo o papel crítico de pontes dissulfeto na manutenção de uma conformação apropriada para a atividade das enzimas, conforme relatado para PG de *S. thermophile* (KAUR *et al.*, 2004). Os aditivos testados ocasionaram uma pequena inibição da atividade de PE, entre 10 e 20%. As pontes dissulfeto parecem não ser imprescindíveis para a estabilidade desta enzima, uma vez que o agente redutor β -mercaptoetanol ocasionou uma baixa inibição (10%). PEG e glicerol foram

utilizados para testes, pois podem ser adicionados em formulações, ou estarem presentes no suco, como é o caso do glicerol presente no vinho, sendo importante testar o efeito destes aditivos.

A atividade de PG presente no preparado enzimático otimizado foi inibida por Zn^{+2} e Cu^{+2} , entre 60-70%, para as duas concentrações testadas, como relatado para a levedura *K. wickerhamii*, também inibida por Zn^{+2} (MOYO *et al.*, 2002). Cs^{+2} e Mg^{+2} estimularam a atividade da enzima. A atividade de PL foi fortemente inibida por Cu^{+2} , com atividade residual de 2%, enquanto Mg^{+2} estimulou a ação da enzima. Efeitos semelhantes foram encontrados para PLs de *P. italicum* (ALAÑA *et al.*, 1990), *B. cinerea* (REYES *et al.*, 1984), *P. amylolyticus* (SAKIYAMA *et al.*, 2001) e *P. paxilli* (SZAJER & SZAJER, 1982). O preparado enzimático contendo PE teve uma diminuição da atividade de 40% quando Cu^{+2} foi adicionado. Houve também um aumento da atividade quando utilizado Mn^{+2} . Estes resultados mostram que os cátions Mg^{+2} , Mn^{+2} e Cs^{+2} poderiam ser utilizados em formulações para aumentar a atividade das enzimas. Como ocorre para outras enzimas, como proteases, estes cátions podem estar recobrando algumas porções da superfície da mesma aumentando a estabilidade, ou interferindo na ação de possíveis inibidores da enzima presentes no preparado. Como ocorre com pectinases de outros organismos, o agente quelante EDTA não inibiu a atividade de PG, PL e PE, sugerindo que cátions não são essenciais para suas atividades. Resultados similares foram detectados para PL de *P. expansum* (SILVA *et al.*, 1993) e *P. italicum* (ALAÑA *et al.*, 1990), para PG de *S. thermophile* (KAUR *et al.*, 2004) e *K. wickerhamii* (MOYO *et al.*, 2002).

Observamos melhoras significativas na extração de sucos para os três preparados testados e nas duas concentrações utilizadas, mantendo o aroma característico de cada fruta. Como descrito por KASHYAP *et al.* (2001), o suco de maçã contém 91-92% de pectina esterificada que pode ser facilmente clarificado com a adição PL. Este resultado foi observado no teste realizado. A adição do preparado enzimático contendo esta enzima diminuiu a turbidez do suco, além de aumentar muito a extração de cor. Quando o preparado contendo PG foi adicionado às frutas testadas, observou-se acentuada diminuição da viscosidade, visto a capacidade que esta enzima tem em diminuir a viscosidade, como amplamente relatado (REXOVÁ-BENKOVÁ & MARKOVIC, 1976; KAWANO *et al.*, 1999; KASHYAP *et al.*, 2001). O aumento da extração de sucos de uva e maçã foi também relatado por KAUR *et al.* (2004) utilizando 3U.g^{-1} de PG de *S. thermophilus*, tendo um aumento de 10 e 30% para uva e maçã, respectivamente. Nos experimentos realizados neste trabalho, obtivemos um aumento de 50 e 110% na extração de sucos com 1U.g^{-1} PG para maçã e laranja, respectivamente, e 30% com 10U.g^{-1} PG para uva. Os melhores resultados de rendimento de suco foram conseguidos com 10U.g^{-1} PL, com um aumento de 50, 250 e 350% para uva, maçã e laranja, respectivamente.

Observa-se claramente a extração de cor para uva, quando adicionado o preparado contendo PG, assim como observado para maçã nos três preparados testados, característica fundamental para os sucos. Além disso, uma das principais características e benefícios relacionados ao consumo de vinho tinto é a presença de antocianinas, substância antioxidante que combate os radicais livres e, possivelmente, a diminuição do colesterol. O uso de pectinases aumenta a

extração deste corante (KASHYAP *et al.*, 2001). A cor é uma característica importante de sucos e, principalmente de vinhos tintos, sendo de extrema relevância para a classificação dos mesmos, podendo contribuir na expansão do mercado nacional e internacional dos vinhos produzidos no país, além de agregar valor ao produto final. A cor também pode ser um fator relevante e diferencial na conquista de novos mercados pelos diferentes sucos produzidos no país.

Os diferentes preparados produzidos por *P. oxalicum*, como mostrado neste trabalho, têm a capacidade de extrair sucos com diferentes características, o que pode ser, comercialmente, de suma importância na conquista de diferentes mercados, atendendo a demanda de anseios por sucos com determinadas características, como mais ou menos cor, maior viscosidade, entre outras. Um diferencial das grandes indústrias na conquista de novos mercados é ter flexibilidade no processo de produção com características diferentes do produto final, o que se pode alcançar com a escolha e a aplicação dos diferentes preparados enzimáticos produzidos neste trabalho, gerando produtos com características diferentes. Além disso, os três preparados obtidos podem ser aplicados em diferentes segmentos na indústria de alimentos.

Preparados pectinolíticos produzidos por outros microrganismos foram testados com o intuito de reduzir a coesão de tecidos vegetais, como na maceração de cenoura e extração de pectina de limão por extratos de *A. kawachii*, (CONTRERAS ESQUIVEL & VOGET, 2004) e na maceração de pepino por PL de *P. italicum* (ALAÑA *et al.*, 1990) e de *P. paxilli* (SZAJER & SZAJER, 1982).

As condições utilizadas para o ensaio de extração de sucos subestimam a condição real, uma vez que, para a extração de sucos na indústria, as frutas são

prensadas. Nos experimentos realizados neste trabalho, não houve qualquer tipo de pressão mecânica, somente o contato das frutas picadas com os preparados enzimáticos testados, seguido da filtragem. Com o processo mecânico associado aos preparados enzimáticos, prática aplicada na indústria, podemos ter resultados ainda mais promissores e significativos, levando a um aumento no aproveitamento da fruta em geral. Os resultados de extração de cor e volume de suco poderiam ser ainda mais pronunciados se associados ao processo de prensagem.

O tratamento das frutas com os preparados pectinolíticos produzidos demonstrou ser comercialmente interessante por: (i) acarretar em um aumento na extração de sucos; (ii) diminuir a viscosidade e turbidez; (iii) aumentar o aproveitamento das frutas (diminuição de resíduos); (iv) aumentar a extração de cor; (v) gerar sucos com características diferentes e, (vi) não necessitar concentrar os preparados produzidos. Além disso, a utilização de resíduos agroindustriais acarreta em diminuição nos custos e aumento da produção das três enzimas testadas neste trabalho.

6. CONCLUSÕES

- O meio de cultivo foi otimizado com resíduos agroindustriais para a produção das três enzimas: PG- 3% casca de maracujá, meio sem tamponamento, 72h e 32^oC, com um aumento de 200%; PL- 2% casca de laranja, 24h, 28^oC e pH 7,0, com um aumento de 400%; PE- 1% casca de laranja, 72h, 28^oC e pH 7,0, com um aumento de 950% em relação a atividade inicial do trabalho.
- PG tem pH ótimo de 5,0, temperatura ótima entre 40 e 50^oC, inibida por SDS (5mM), β -mercaptoetanol, Cu^{+2} e Zn^{+2}
- PL tem pH ótimo 6,0, temperatura ótima de 40^oC, inibida por SDS (5mM), β -mercaptoetanol, PEG 6000, glicerol e Cu^{+2}
- PE tem pH ótimo 9,0, temperatura ótima de 40^oC, inibida por Cu^{+2}
- Preparados pectinolíticos produzidos por *P. oxalicum* aumentam a extração de suco e cor e diminuem a turbidez das frutas testadas, em especial para a concentração de 10 U/g fruta

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE- Associação Brasileira de Enologia (2005). Comunicação pessoal.
- ABECITRUS- Associação Brasileira dos Exportadores de Cítricos (2005) <http://www.abecitrus.com.br>. 15 de julho.
- AGUILAR, G. & HUITRON, C. (1987) Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus* sp. by galacturonic acid and glucose addition. **Enz. Microbiol. Technol.** 9:690-696
- AGUILAR, G. & HUITRON, C. (1990) Constitutive exo-pectinase produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon sources. **Biotechnol. Lett.** 12:655-660
- AIZENBERG, V.L., ZAKHARCHENKO, V.A., SEMAKOVA, M.V., SYRCHIN, S.A., SEDINA, S.A., KAPICHON, A.P. (2002) Selection of pectinesterase overproducing fungal strains for the low degree methoxylated pectin preparation. **Mikrobiol Z.** 65:18-23
- ALAIÑA, A., ALKORTA, I., DOMÍNGUEZ, J.B., LLAMA, M.J., SERRA, J.L. (1990) Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. **App. Environm. Microbiol.** 56:3755-3759
- ALBERSHEIM P., KILLIAS U. (1962) Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. **Arch. Biochem. Biophys.** 97:107-115.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. (1997) **Biologia Molecular da Célula**, 3.ed. Artes Médicas.
- ALKORTA, I., GARBISU, C., LLAMA, M.J., SERRA, J.L. (1998) Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Proc. Biochem.** 33:21-28
- BAILEY, M.J., PESSA, E. (1990) Strain and process for production of polygalacturonase. **Enz. Microb. Technol.** 12:266-271
- BARACAT, M.C., VALENTIM, C., MUCHOVEJ, J.J., SILVA, D.O. (1989) Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. **Biotechnol. Lett.** 11:899-902.

- BARACAT-PEREIRA, M.C., COELHO, J.L.C., SILVA, D.O. (1994) Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose and yeast extract for degumming of natural fibers. **Lett. Appl. Microbiol.** 18:127-129.
- BARNBY, F.M., MORPETH, F.F., PYLE, D.L. (1990) Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification, and partial characterization of the enzyme. **Enz. Microb. Technol.** 12:891-897
- BERGEY, D.R., OROZCO-CARDENAS, M., de MOURA, D.S., RYAN, C.A. (1999) A wound- and systemic-induced polygalacturonase in tomato leaves. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96:1756-1760
- BIBVIRT- USP- Universidade de São Paulo (2005) <http://www.bibvirt.futuro.usp.br/especiais/frutasnobrasil>. 16 de junho.
- BLANDINO, A., DRAVILLAS, K., CANTERO, D., PANDIELLA, S.S., WEBB, C. (2001) Utilization of whole wheat flour for the production of extracellular pectinases by some fungal strains. **Proc. Biochem.** 37:497-503
- BORIN, M.F., SAID, S., FONSECA, M.J.V. (1996) Purification and biochemical characterization of an extracellular endopolygalacturonase from *Penicillium frequentans*. **J. Agric. Food Chem.** 44:1616-1620
- BOUVIER, F. & ENTRESSANGLES, B. (1992) Utilization of cellulases and pectinases in the extraction of palm oil. **Rev. Fr. Crops Gras.** 39:245-252
- BRUMANO, M.H.N., COELHO, J.L.C., ARAUJO, E.F., SILVA, D.O. (1991) Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions. **World J Microbiol Biotechnol.** 9:225-228
- CHRISTGAU, S., KOFOD, L.V., HALKIER, T., ANDERSEN, L.N., HOCKAUF, M., DORREICH, K., DALBOGE, H., KAUPPINEN, S. (1996) Pectin methyl esterase from *Aspergillus aculeatus*: expression cloning in yeast and characterization of the recombinant enzyme. **Biochem. J.** 319:705-712
- COLLIMER, A. KEEN, N.T. (1986) The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. **Ann. Rev. Phytopathol.** 24:384-409

- CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C. & VOGET, C.E. (2004) Purification and partial characterization of an acidic polygalacturonase from *Aspergillus kawachii*. **J. Biotechnol.** 110: 21-28
- CROTTI, L.B., JABOR, V.A., CHELLEGATTI, M.A., FONSECA, M.J., SAID, S. (1999) Studies of pectic enzymes produced by *Talaromyces flavus* in submerged and solid substrate cultures. **J. Basic Microbiol.** 39:227-235
- DA SILVA, R., FRANCO, C.M., GOMES, E. (1997) Pectinases, hemicelulases e celulases: ação, produção e aplicação no processamento de alimentos – revisão. **Bol. SCTA**, 31:249-260
- DOS, S., FONSECA, M.J.V., SAID, S. (2002) Purification and partial characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium frequentans*. **Microbiol. Res.** 157:19-24
- FAWOLE, O.B. & ODUNFA, S.A. (2003) Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **Int. Biodet. Biodeg.** 52:223-227
- FERNANDES-SALOMÃO, T.M., AMORIM, A.C.R., CHAVES-ALVES, V.M., COELHO, J.L.C., SILVA, D.O., ARAUJO, E.F. (1996) Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. **Rev. Microbiol.** 27:15-18.
- FOGARTY, W.M., KELLY, C.T. (1983) Pectic enzymes. *In*: Fogarty, W.M., Microbial enzymes and biotechnology. **Appl. Science**, p.131.
- FONTANA, R.C., SALVADOR, S., SILVEIRA, M.M. (2005) Influence of pectin and glucose on growth and polygalacturonase production by *Aspergillus niger* in solid-state cultivation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** In press.
- FREITAS, S.P., COURI, S., LAGO, R.C.A. (1997) Enzimas na extração aquosa de óleos vegetais. *In*. **3^o ENZITEC**: Anais, Rio de Janeiro, 29-31 outubro.
- GUMMANDI, S.N. & PANDA, T. (2003) Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. **Proc. Biochem.** 38:987-996
- HANKIN, L., ANAGNOSTAKIS, S.L. (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycol.** 67:597-607
- HOONDAL, G.S., TIWARI, R.P., TEWARI, R., DAHIYA, N., BEG, Q.K. (2002) Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59:409-418

- HOURS, R.A., VOGET, C.E., ERTOLA, R.J. (1988) Some factors affecting pectinase production from apple pomace in solid cultures. **Biol. Wastes** 24:147-157
- IKOTUN, T. (1984) Isolation, purification and assay of the macerating enzyme produced by *Penicillium oxalicum* Curie and Thom. **Z. Allg. Mikrobiol.** 24:247-252
- ISMAIL, A.S. (1996) Utilization of orange peels for the production of multienzyme complexes by some fungal strains. **Proc. Biochem.** 31:645-650
- KASHYAP, D.R., SONI, S.K., TEWARI, R. (2003) Enhanced production of pectinases by *Bacillus* sp. DT7 using solid state fermentation. **Biores. Technol.** 88:251-254
- KASHYAP, D.R., VOHRA, P.K., CHOPRA, S., TEWARI, R. (2001) applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Biores. Technol.** 77:215-227
- KAUR, G., KUMAR, S., SATYANARAYANA, T. (2004) Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis. **Biores. Technol.** 94:239-243
- KAWANO, C.Y., CHELLEGATI, M.A.S.C., SAID, S., FONSECA, M.J.V. (1999) Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 29:133-140
- LADJAMA, A., CHARDON-LORIAUX, I., FOGLIETTI, M.J. (1991) On the pectolytic activity of two *Streptomyces* strains. **FEMS Microbiol. Lett.** 79:279-284
- LANG, C. & DÖRNENBURG, H. (2000) Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. **Appl. Microbial. Biotechnol.** 53:366-375.
- LEONE, G., VAN DER HEUVEL, J. (1987) Regulation by carbohydrates of the sequential *in vitro* production of pectic enzymes by *Botrytis cinerea*. **Can. J. Bot.** 65:2133-2142
- LIN, M.T., DIANESE, J.C. (1976) A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* sp. **Phytopathol.**, 66:1466-1469
- LNF – Latino Americana (2005). www.lnf.com.br. 19 de junho.

- MALDONADO, M.C., STRASSER de SAAD, A.M. (1998) Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state system. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 20:34-38
- MANACHINI, P.L., PARINI, C., FORTINA, M.G. (1988) Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* LV 10. **Enz Microbiol Technol.** 10:682-685
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2005) <http://www.agricultura.gov.br>. 17 de julho.
- MARTÍNEZ, M.J., ALCONADA, M.T., GUILLÉN, G., VÁZQUEZ, C., REYES, F. (1991) Pectic activities from *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*: purification and characterization of an exopolygalacturonase. **FEMS Microbiol. Lett.** 81:145-150
- MILLER, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31:426
- MINUSSI, R.C., SOARES-RAMOS, J.R.L., COELHO, J.L.C., SILVA, D.O. (1998) Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. **Rev. Microbiol.** 29:246-250
- MOYO, S., GASHE, B.A., COLLISON, E.K., MPUCHANE, S. (2002) Optimising growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. **Int. J. Food Microbiol.** 85:87-100
- NAIR, S.R., RAKSHIT, S.K., PANDA, T. (1995) The effect of carbon sources on the synthesis of pectinases by *Aspergilli*. **Bioprocess Eng.** 13:37-40
- OLANO-MARTIN, E., RIMBACH, G.H., GIBSON, G.R., RASTALL, R.A. (2003) Pectin and pectic-oligosaccharides induce apoptosis in *in vitro* human colonic adenocarcinoma cells. **Anticancer Res.** 23:341-346
- OLSSON, L., CHRISTENSEN, T.M.I.E., HANSEN, K.P., PALMQVIST, E.A. (2003) Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enz.Microb.Technol** 33:612-619
- PASTOR, M.D., LORDA, G.S., BALATTI, A. (2002) Production of pectinases by *Penicillium simplicicium* A3263 in an amaranth-seed flour medium. **Rev. Argent. Microbiol.** 34:15-21

- PITT, J.I. (2000) A laboratory to common *Penicillium* species. **Australia Food Science**, 197pp.
- PRADE, R.A., ZHAN, D.F., AYOUBI, P., MORT, A.J. (1999) Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. **Biotechnol. Genet. Eng. Rev.** 16:361-391
- REXOVÁ-BENKOVÁ, L., & MARKOVIC, O. (1976) Pectic enzymes. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.** 33:323-385
- ROUMBOUTS, F.M., & PILNIK, W. (1980) Pectic enzymes. *In*: ROSE, A.H. (Ed.) **Economic Microbiology**, London: Academic Press, p. 227
- REYES, F., MARTINEZ, M.J., LA HOZ, R., ARCHER, S.A. (1984) Characterization as glycerol of an inhibitor of pectin lyases from autolysing cultures of *Botrytis cinerea*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 82:689-696
- SAKAI, T., SAKAMOTO, T., HALLAERT, J., VANDAMME, E.J. (1993) Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. **Adv. Appl. Microbiol.** 39:213-294
- SAKIYAMA, C.C., PAULA, E.M., PEREIRA, P.C., BORGES, A.C., SILVA, D.O. (2001) Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. **Lett. Appl. Microbiol.** 33:117-121
- SECEX – Secretaria de comercio exterior (2005) Ministério do Desenvolvimento e Comércio Exterior <http://www.desenvolvimento.gov.br/secex> . 17 de julho.
- SHARMA, D.C., SATYANARAYANA, T. (2005) A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. **Biores. Technol.** In press.
- SILVA, D.O., ATTWOOD, M.M., TEMPEST, D.W. (1993) Partial purification and properties of pectin lyase from *Penicillium expansum*. **W. J. Microbiol. Biotechnol.** 9:574-578
- SILVA, E.G., BORGES, M.F., MEDINA, C., PICCOLI, R.H., SCHWAN, R.F. (2005) Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Res.** 5:859-865
- SIROTEK, K., MAROUNEK, M., RADA, V., BENDA, V. (2001) Isolation and characterization of rabbit caecal pectinolytic bacteria. **Folia Microb.** 46:79-82

- SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., *et al.* (1985) Measurement of the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 150:76-85
- SOUZA, J.V.B., SILVA, E.S., MAIA, M.L.S., TEIXEIRA, M.F.S. (2003) Screening of fungal strain for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Paecilomyces clavissporus* 2A.UMIDA.1. **Proc. Biochem.** 39:455-458
- SZAJER, I. & SZAJER, C. (1982) Pectin lyase of *Penicillium paxilli*. **Biotechnol. Lett.** 4:549-552
- TANNER, R.D., PROKOP. A., BAJPAI, R.K. (1993) Removal of fiber from vines by solid-state fermentation/enzymic degradation: a comparison of flax and kutzu retting. **Biotechnol. Adv.** 11:635-643
- TEIXEIRA, M.F.S., LIMA FILHO, J.L., DURAN, N. (2000) Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japonicus* 586. **Rev. Microbiol.** 31:286-290
- THAKUR, B.R., SINGH, R.K., HANDA, A.K. (1997) Chemistry and uses of pectin – a review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 37:47-73
- UEDA, S., FUJIO, Y., LIM, J.Y. (1982) Production and some properties of pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A-3. **J. Appl. Biochem.** 4:524-532
- UHLIG, G. (1998) **Industrial enzymes and their applications.** John Wiley & Sons Inc. New York.
- VILARIÑO, C., DEL GIORGIO, J.F., HOURS, R.A., CASCONI, O. (1993) Spectrophotometric method for fungal pectinesterase activity determination. **Lebensm. Wiss. U. Technol.** 26:107-110.
- WHITAKER, J.R. (1984) Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. **Enz. Microbiol. Technol.** 6:341-349
- WINBORNE, M.P. & RICHARD, P.A.D. (1978) Pectinolytic activity of *Saccharomyces fragilis* cultured in controlled environments. **Biotechnol. Bioeng.** 20:231-242
- ZETELAKI-HORVÁTH, K. (1982) Factors affecting pectin lyase activity. **Acta Aliment.** 11:21-29

Anexo - Curriculum Vitae

Nome: **LUCÉLIA SANTI**

Idade: 27 anos (19/01/1978)

E-mail: lsanti@cbiot.ufrgs.br

1) Títulos acadêmicos

- Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2003)
- Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ênfase molecular (2003)
- Mestrado - Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) - Centro de Biotecnologia / Universidade Federal do Rio Grande do Sul (em andamento).

2) Atividades científicas e técnicas

2.1) Artigos publicados em periódico científico:

a) Periódicos científicos internacionais (indexados):

GIMÉNEZ-PECCI, M.P.; BOGO, M.R.; **SANTI, L.**; MORAES, C.K.; CORRÊA, C.T.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. (2002) Characterization of mycoviruses and analyses of chitinases secretion in the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae*. **Current Microbiology**, 45:334-339.

BARATTO, C.M.; SILVA, M.V.; **SANTI, L.**; PASSAGLIA, L.M.P.; SCHRANK, I.S.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. (2003). Expression and characterization of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* 42 kDa chitinase in *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, 49:1-4.

SILVA, M.V., **SANTI, L.**, STAATS, C.C., COSTA, A.M., COLODEL, E.M., DRIEMEIER, D., VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. (2005) Cuticle-induced endo/exoacting chitinase CHIT30 from *Metarhizium anisopliae* is encoded by an ortholog of the *chi3* gene. **Research in Microbiology**, 156:382-392.

b) Revista nacional não indexada:

FRANCESCHINI, M.; GUIMARÃES, A.P.; CAMASSOLA, M.; FRAZZON, A.P.; BARATTO, C.M.; KOGLER, V.; SILVA, M.V.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; CASTRO, L.; **SANTI, L.**; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, A. (2001) Biotecnologia aplicada ao controle biológico. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. 23: 32-37.

2.2) Manuscritos submetidos:

a) Periódicos científicos internacionais (indexados):

SANTI, L., SILVA, W.O.B., CORRÊA, A.P.F., VAINSTEIN, M.H. (2005) Pectinases production by a Brazilian strain of *Penicillium oxalicum* using agroindustrial residues. **Enzyme and Microbial Technology** (ENZMICTEC-D-05-00237)

SILVA, W.O.B., CORRÊA, A.P.F., **SANTI, L.**, SILVA, L.A.D., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2005) Lipolytic activity during the process of host infection by *Metarhizium anisopliae* in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Journal of Invertebrate Pathology** (JIP-05-90)

2.3) Trabalho de conclusão:

Otimização do processo de purificação de uma quitinase de *Metarhizium anisopliae* e produção de anticorpos policlonais – Monografia apresentada para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – ênfase Molecular, Celular e Funcional pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2.4) Apresentação de pôster e/ou publicação de resumo em anais ou Salão de Iniciação Científica

a) Estadual, regional ou salão IC:

- SANTI, L., MORAES, C.K., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H.** (2000) Purificação de quitinases do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. **Livro de resumos II Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS**, Porto Alegre – RS, p.50.
- SANTI, L., MORAES, C.K., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H.** (2000) Purificação de quitinases do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. **XII Salão de Iniciação Científica**, Porto Alegre – RS, p.253.
- SANTI, L., SILVA, M.V., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H.** (2002) Purificação parcial de uma quitinase extracelular produzida por *Metarhizium anisopliae*. **XIII Salão de Iniciação Científica**, Porto Alegre – RS, p.326.
- SANTI, L., SILVA, M.V., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H.** (2002) Purificação parcial de quitinases produzidas por *Metarhizium anisopliae*. **XIV Salão de Iniciação Científica**, Porto Alegre – RS, p.337.
- SANTI, L., SCHRANK, A., SILVA, M.V., VAINSTEIN, M.H.** (2002) Otimização do processo de purificação de uma quitinase de *Metarhizium anisopliae* e produção de anticorpos policlonais. **XV Salão de Iniciação Científica**, Porto Alegre – RS, p.359.
- SANTI, L., SILVA, W.O.B., CORREA, A.P.F., VAINSTEIN, M.H.** (2004) Produção de pectinases por *Penicillium oxalicum* utilizando resíduos agroindustriais. **Livro de resumos VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS**, Porto Alegre – RS, p.78.
- SILVA, W.O.B., SANTI, L., CORREA, A.P.F., SILVA, L.A.D., VAINSTEIN, M.H.** (2004) Atividade lipolítica de *Metarhizium anisopliae* durante o processo de infecção do carrapato bovino *Boophilus microplus*. **Livro de resumos VI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – UFRGS**, Porto Alegre – RS, p.86.

b) Nacional

- PAESI-TORESAN, S.O., **SANTI, L.**, MARIS, A.S.P., BONATO, D., HENRIQUES, J.A.P. (1997) O produto do gene RAD16 de *Saccharomyces cerevisiae* é indispensável para a indução de RNR, genes induzíveis por danos ao DNA. **Livro de resumos do 43º Congresso Nacional de Genética**, Goiânia – GO, p.245.
- SANTI, L.**, MORAES, C.K., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2000) Análise da secreção de quitinases e proteases em diferentes linhagens do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*. Existe diferença na infectividade entre as linhagens infectadas ou não infectadas por micovírus? **Livro de resumos do 46º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia – SP, p.341.
- SANTI, L.**, SILVA, M.V., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2001) Purification of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Livro de resumos da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq**, Caxambu – MG, p.66.
- SANTI, L.**, SILVA, M.V., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2002) Regulação da secreção de quitinases do entomopatógeno e acaricida *Metarhizium anisopliae*. **Livro de Resumos da XXIII Reunião de Genética de Microrganismos**, Pirenópolis – GO, p.79.
- SILVA, M.V., **SANTI, L.**, COSTA, A.C.O., VAINSTEIN, M.H., SCHRANK, A. (2002) Clonagem e caracterização do gene que codifica a quitinase CHIT30 de *Metarhizium anisopliae*. **Livro de Resumos da XXIII Reunião de Genética de Microrganismos**, Pirenópolis – GO, p.81.
- SANTI, L.**, SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2004) Produção de poligalacturonase por fungos filamentosos em meio líquido e semi-sólido. **Livro de Resumos da XXIV Reunião de Genética de Microrganismos**, Gramado – RS, p.75.
- SANTI, L.**, MITIDIERI, S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H. (2004) Isolamento, seleção e produção de poligalacturonase por fungos filamentosos em meio

líquido e semi-sólido. **Livro de resumos do VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, Rio de Janeiro – RJ, p.83.

2.5) Premiações e destaques por desempenho científico-acadêmico:

- O trabalho: Otimização do processo de purificação de uma quitinase de *Metarhizium anisopliae* e produção de anticorpos policlonais, apresentado no XV Salão de Iniciação Científica, em 2003, recebeu DESTAQUE.

- 3º lugar na IV Maratona de Empreendedorismo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o Plano de Negócios BIOPLUS, em janeiro de 2004.

2.6) Bolsa de Iniciação Científica:

- Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Enobiotecnologia.

Título: Os fatores “killers” de leveduras na indústria de vinificação.

Período: setembro/1996 a agosto/1997

Orientador: prof. Dr. Juan L. Carrau

Agência financiadora: UCS

- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (EMBRAPA - CNPUV), Laboratório de Microbiologia

Título: Seleção de leveduras e produtos de metabólitos.

Período: setembro/1997 a junho/1999

Orientador: Prof. Dr. Gildo A. da Silva

Agência financiadora: EMBRAPA

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia, Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos

Título: Construção de linhagens transgênicas de fungos filamentosos para o controle biológico

Período: abril/2000 a fevereiro/2001

Orientador: prof. Dr. Augusto Schrank

Agência financiadora: FAPERGS

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia, Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica

Título: Regulação da secreção de quitinases e proteases do entomopatógeno e acaricida *Metarhizium anisopliae*

Período: março/2001 a fevereiro/2003

Orientador: prof. Dra. Marilene H. Vainstein

Agência financiadora: FAPERGS

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia, Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica

Título: Análise comparativa da síntese de quitinases dos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Trichoderma harzianum*

Período: maio/2003 a fevereiro/2004

Orientador: prof. Dra. Marilene H. Vainstein

Agência financiadora: FAPERGS

3) Atividades relacionadas ao ensino

a) Docência em curso de extensão:

Curso: Biotecnologia, clonagem e transgênicos, ministrado para alunos da 3ª série do ensino médio do Colégio Anchieta (11h).

4) Atividades profissionais

a) Estágios extra-curriculares:

- Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Enobiotecnologia
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho (EMBRAPA - CNPUV), Laboratório de Microbiologia
- Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Centro de Biotecnologia, Laboratório de Biologia Molecular de Fungos Filamentosos e Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica

b) Participação em cursos de extensão e atualização:

- Curso: Biologia e comportamento das serpentes do Rio Grande do Sul, promovido pela Universidade de Caxias do Sul, no período de 16 a 23 de abril de 1996, Caxias do Sul – RS.
- Curso: Organização e montagem de um laboratório alternativo para o ensino de Ciências, promovido pela Universidade de Caxias do Sul, em 26 de junho de 1996 (8 horas/aula), Caxias do Sul – RS.
- Curso de extensão: Biologia Molecular aplicada à Clínica, promovido pela Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, no período de 07 a 09 de agosto de 2000, Porto Alegre – RS.
- Curso: Produção e análise de produtos transgênicos, promovido pelo 46º Congresso Nacional de Genética, no período de 19 a 23 de setembro de 2000, Águas de Lindóia – SP.

- Curso: Eletroforese Bi-dimensional, promovido pela Amersham Biosciences do Brasil, no período de 10 a 12 de julho de 2001, Porto Alegre – RS.
- Seminário de Atualidades Genéticas, promovido pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, no período de 10 a 12 de abril de 2002, Porto Alegre – RS.
- Curso teórico-prático: Seqüenciamento e análise de genomas II, promovido pelo Grupo de Genômica Estrutural e Funcional, no período de 08 a 12 de novembro de 2004, Porto Alegre – RS.

c) Participação em eventos e representação em entidades de classe:

- XXIII Congresso Brasileiro de Zoologia, Cuiabá – 13 a 18 de fevereiro de 2000.
- 46º Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia – 19 a 23 de setembro de 2000.
- XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu – 19 a 22 de maio de 2001.
- XXIII Reunião de Genética de Microrganismos, Pirenópolis – 3 a 5 de março de 2002.
- XI Reunião Estadual de Biotecnologia Vegetal, Bento Gonçalves – 6 e 7 de novembro de 2002.
- XXIV Reunião de Genética de Microrganismos (REGEM), Gramado – 07 a 10 de março de 2004.
- VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (ENZITEC), Rio de Janeiro – 05 a 07 de abril de 2004.