

DANIEL BONOTO GONÇALVES

PRODUÇÃO DE PECTINA LIASE E POLIGALACTURONASE PELA  
LINHAGEM RECOMBINANTE *Penicillium griseoroseum* T20

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção de título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
BRASIL - MINAS GERAIS  
2008

DANIEL BONOTO GONÇALVES

PRODUÇÃO DE PECTINA LIASE E POLIGALACTURONASE PELA  
LINHAGEM RECOMBINANTE *Penicillium griseoroseum* T20

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção de título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de outubro de 2008

---

Prof.<sup>a</sup> Denise Mara Soares Bazzolli  
(Co-orientadora)

---

Prof. Marcos Rogério Tótola

---

Prof. Sebastião Tavares de Rezende

---

Prof. Frederico José Vieira Passos

---

Prof.<sup>a</sup> Elza Fernandes de Araújo  
(Orientadora)

## **Ao Mestre da Vida**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade em realizar este curso.

Ao CNPq e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

À professora Elza Fernandes de Araújo, pela orientação segura e acertada, pela minha formação profissional desde a graduação e pelo exemplo diário de determinação, de trabalho dedicado, de ética, de competência e de vitória. Por ter sido, durante seis anos de convivência, a minha principal referência profissional.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pelos ensinamentos e pela atenção a mim dedicada.

À professora Denise Mara Soares Bazzolli, pelos conselhos durante a realização deste trabalho, pela amizade e pelo carinho.

Aos professores Sebastião Tavares de Rezende, Marcos Rogério Tótola e Frederico José Vieira Passos pela participação na banca de defesa da dissertação.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pela dedicação dispensada aos alunos.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial, Danilo, Paulo Rosa, Toninho e Jaqueline, pelo carinho e Evandro, pela amizade e ajuda nos experimentos.

À minha colega de trabalho e amiga Janaína, pelo companheirismo e imprescindível ajuda durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, pelos momentos de convivência.

Aos amigos e irmãos Helson, Maycon, Leandro, Rodrigo, Sávio, Guilherme e Marcos, pelo apoio incondicional em todos os momentos e pela amizade sincera, que é um santo remédio.

À minha namorada e companheira Marina, por todos os momentos de compreensão, de apoio e de ajuda.

À minha querida família, que em tudo sempre me apoiou.

## **BIOGRAFIA**

Daniel Bonoto Gonçalves, filho de Antônio Gonçalves de Oliveira e Amélia Filgueiras Bonoto de Oliveira, nasceu no dia 30 de setembro de 1982, em Ubá, Minas Gerais.

Em março de 2002, iniciou o curso de Bacharelado em Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, graduando-se em outubro de 2006.

Em outubro de 2006, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

## SUMÁRIO

ABREVIACÕES .....	vii
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Pectinas .....	4
2.2. Enzimas pectinolíticas .....	6
2.3. Sistemas de produção de pectinases .....	8
2.4. Otimização da produção de pectinases .....	13
2.5. Cinética de processos fermentativos .....	16
2.6. Mercado de enzimas .....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
3.1. Microrganismos utilizados .....	19
3.2. Manutenção dos estoques das culturas e obtenção do inóculo de trabalho .....	19
3.3. Cultivo em fermentação submersa .....	19
3.3.1 Fermentação em frascos Erlenmeyer .....	19
3.3.2 Fermentação em biorreator .....	21
3.4. Planejamento experimental .....	21
3.5. Parâmetros cinéticos .....	22
3.6. Procedimentos analíticos .....	24
3.6.1. Ensaio enzimático de pectina liase, poligalacturonase, protease e $\beta$ - glicosidade .....	24
3.6.2. Determinação de proteína total no filtrado da cultura. ....	25
3.6.3. Avaliação do crescimento micelial .....	25

3.7. Avaliação do perfil protéico extracelular .....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Otimização da produção de pectina liase e poligalacturonase usando a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM).....	27
4.2. Produção de pectina liase e poligalacturonase em biorreator.....	37
4.3. Avaliação do crescimento e morfologia miceliais da linhagem <i>Penicillium griseoroseum</i> T20 durante a fermentação .....	42
4.4. Cinética do processo fermentativo.....	48
5. DISCUSSÃO.....	52
6. CONCLUSÕES.....	55
7. REFERÊNCIAS .....	56

## ABREVIações

$X_{\max}$	biomassa máxima;
$Q_{t\max}$	proteína total máxima;
$P_{PL\max}$	atividade de pectina liase máxima;
$P_{PG\max}$	atividade de poligalacturonase máxima;
$t_{fPL}$	tempo correspondente à máxima atividade de pectina liase;
$t_{fPG}$	tempo correspondente à máxima atividade de poligalacturonase;
$P_x$	produtividade em biomassa;
$Pd_P$	produtividade enzimática;
$Pd_{PL}$	produtividade de pectina liase;
$Pd_{PG}$	produtividade de poligalacturonase;
$P_{specM}$	atividade enzimática específica em relação à biomassa;
$P_{specPLm}$	atividade específica de pectina liase em relação à biomassa;
$P_{specPGm}$	atividade específica de poligalacturonase em relação à biomassa;
$P_{specP}$	atividade enzimática específica em relação à proteína total;
$P_{specPLp}$	atividade específica de pectina liase em relação à proteína total;
$P_{specPGp}$	atividade específica de poligalacturonase em relação à proteína total;
$R_{X/S}$	fator de conversão de substrato em biomassa;
$R_{P/S}$	fator de conversão de substrato em produto;
$R_{PL/S}$	fator de conversão de substrato em pectina liase;
$R_{PG/S}$	fator de conversão de substrato em poligalacturonase.



## RESUMO

GONÇALVES, Daniel Bonoto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2008. **Produção de pectina liase e poligalacturonase pela linhagem recombinante *Penicillium griseoroseum* T20.** Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Co-Orientadoras: Marisa Vieira de Queiroz e Denise Mara Soares Bazzoli.

Fungos filamentosos são reconhecidos como excelentes produtores de enzimas extracelulares e as linhagens geneticamente modificadas têm tornado possível a produção de pectinases com maior especificidade e pureza, melhor utilização de matéria-prima e menor produção de resíduos. O processo de produção de pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG) pela linhagem geneticamente modificada *Penicillium griseoroseum* T20 foi estudado. As condições ótimas de cultivo para a produção de PL e PG foram determinadas por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM). A maior produção de PL em frascos Erlenmeyer com 200 mL de meio de cultivo foi obtida após 87,7 h em meio contendo sacarose em concentração inicial de 15,7 g/L, sendo a maior atividade de PL estimada de 2.428 U/mL. A maior produção de PG em frascos Erlenmeyer com 200 mL de meio de cultivo foi obtida após 83,8 h, sendo a maior atividade de PG estimada de 9.465 U/mL. A concentração de sacarose não mostrou influência significativa sobre a produção dessa enzima. Após otimização dos fatores tempo de cultivo e concentração de sacarose em Erlenmeyers, foi feito o escalonamento para biorreator com 10 L de trabalho. A condição de aeração que proporcionou a maior atividade de PL e PG foi de 1,0 L de ar por minuto. Nessa condição, a linhagem apresentou baixa atividade de protease no período final de cultivo e não foi detectada atividade de  $\beta$ -glicosidase. O perfil protéico da linhagem recombinante T20 mostrou a presença de duas bandas de proteínas distintas com aproximadamente 38 e 36 kDa, correspondentes à PG e à PL, respectivamente. O crescimento micelial da linhagem *P. griseoroseum* T20 foi estudado por meio da RSM, e a massa micelial seca máxima estimada foi de 8,63 g/L, na condição de 30 g/L de sacarose após 120 horas de cultivo. A avaliação da morfologia micelial sugeriu a existência de uma relação entre a ocorrência de hifas livres e dispersas e a produção de PL e PG. Os parâmetros cinéticos da fermentação foram determinados e comparados entre as escalas de produção de PL e PG. A proteína total máxima observada foi de 9,1 e 9,5 mg/L nos cultivos de 200 mL e

10 L, respectivamente. As atividades específicas de PL ( $P_{\text{spePLp}}$ ) e PG ( $P_{\text{spePGp}}$ ) em relação à proteína total foram de 353 e 613 U/ $\mu\text{g}$  no cultivo em 200 mL e de 305 e 1.106 U/ $\mu\text{g}$  no cultivo em 10 L, respectivamente. As produtividades enzimáticas máximas de PL ( $Pd_{\text{PL}}$ ) e PG ( $Pd_{\text{PG}}$ ) observadas foram de 33,4 e 73,3 U/mL.h em 200 mL e de 24,1 e 289 U/mL.h em 10 L. Os parâmetros rendimento de PL ( $R_{\text{PL/S}}$ ) e de PG ( $R_{\text{PG/S}}$ ) calculados foram de 214 e 352 no cultivo em 200 mL e de 87,4 e 1.049 no cultivo em 10 L, respectivamente. A produção de PL e PG entre as linhagens *P. griseoroseum* T20 e *P. griseoroseum* selvagem foi comparada e aumentos de mais 400 vezes na produção de PL e de pelo menos 14 vezes na produção de PG foram observados. Os resultados sugerem o grande potencial de aplicação industrial dessa linhagem para a produção de PL e PG.

## ABSTRACT

GONÇALVES, Daniel Bonoto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2008. **Production of pectin lyase and polygalacturonase by recombinant strain *Penicillium griseoroseum* T20.** Adviser: Elza Fernandes de Araújo. Co-advisers: Marisa Vieira de Queiroz and Denise Mara Soares Bazzoli.

Filamentous fungi are recognized as excellent producers of extracellular enzymes and the genetically modified strains have made possible the production of pectinases with greater specificity and purity, better use of raw materials and lower production of waste. The production of pectin lyase (PL) and polygalacturonase (PG) by genetically modified strain *Penicillium griseoroseum* T20 has been studied. The response surface methodology (RSM) was used to optimize PL and PG production. The parameters sucrose concentration and cultivation time were evaluated. The highest PL production in Erlenmeyer flasks with 200 mL of culture medium was achieved after 87.7 h in sucrose 15.7 g/L and the highest PL estimated activity was 2428 U/ml. The higher PG production in Erlenmeyer flasks with 200 mL of culture medium was achieved after 83.8 hours and the highest PG estimated activity was 9465 U/ml. The sucrose concentration showed no significant influence on the production of this enzyme. The optimization in Erlenmeyer flasks was followed by the scale-up to 10 L bioreactor. The aeration conditions were evaluated and the highest PL and PG activity was observed in 1.0 L of air per minute. Under this condition, the strain showed low protease activity, just in the final period of cultivation, and  $\beta$ -glucosidase activity was not detected. The protein profile of the recombinant strain T20 showed the presence of two distinct bands of with approximately 38 and 36 kDa. These bands corresponded to PL and PG, respectively. The mycelial growth of the strain *P. griseoroseum* T20 has been studied by RSM, and the maximum mycelial dry weight observed was 8.63 g/L, on 30 g/L sucrose and 120 hours of cultivation. The mycelial morphology suggested a link between the occurrence of free and dispersed hyphae and the production of PL and PG. The kinetic parameters of fermentation were determined and compared between the scales of PL and PG production. The maximum total protein was 9.1 and 9.5 mg/L in cultures of 200 ml and 10 L, respectively. The specific PL ( $P_{\text{spePLp}}$ ) and PG ( $P_{\text{spePGp}}$ ) activities in relation to total protein were 353 and 613 U/g at 200 mL cultivation and 305 and 1106 U/g at 10 L cultivation,

respectively. The maximum yield of PL ( $Pd_{PL}$ ) and PG ( $Pd_{PG}$ ) observed were 33.4 and 73.3 U/mL.h at 200 mL cultivation and 24.1 and 289 U/L.mL.h at 10 L. The performance parameters of PL ( $R_{PL/S}$ ) and PG ( $R_{PG/S}$ ) were 214 and 352 at 200 ml cultivation and 87.4 and 1049 at 10 L, respectively. The PL and PG production between *P. griseoroseum* T20 and *P. griseoroseum* wide type strain was compared. Increases of more than 400 times in the PL production and at least 14 times in the PG production were observed. The results suggest the great potential for industrial application of this strain for the production of PL and PG.

## 1. INTRODUÇÃO

As pectinases são enzimas empregadas em diversos segmentos industriais, como nas indústrias de alimentos, de sucos, de vinho e têxteis, movimentando, no Brasil, aproximadamente R\$ 6 milhões ao ano. Segundo o Ministério da Agricultura, um aumento considerável da produção de sucos de frutas tem se observado nos últimos anos, levando ao aumento da demanda de enzimas pécnicas. Considerando sua importância industrial, essas enzimas têm sido alvo de muitos estudos.

As enzimas pectinolíticas atuam na degradação da pectina, um polissacarídeo complexo encontrado na lamela média e na parede celular primária de vegetais superiores. O complexo pectinolítico inclui enzimas responsáveis pela despolimerização da pectina, sendo as pectina liases (PL) e as poligalacturonases (PG) de grande relevância. PL e PG catalisam a clivagem das ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas do ácido poligalacturônico e do ácido pécnico, respectivamente.

Preparações de enzimas pectinolíticas têm sido utilizadas industrialmente há mais de 70 anos. Atualmente, existe no mercado uma grande variedade dessas preparações. Entretanto, pectinases não são produzidas no Brasil, e nosso mercado é dependente de importação. Em 2005, o Brasil importou US\$ 100 milhões em enzimas. O preço por litro de enzimas pectinolíticas importadas pode chegar a R\$ 7,5 mil.

Fungos filamentosos são conhecidos como bons produtores de enzimas, entre elas as pectinolíticas. O fungo *Penicillium griseoroseum* foi isolado na Universidade Federal de Viçosa e depositado na Fundação Tropical de Tecnologia e Pesquisas André Tosello, sob o código de registro CCT6421. Este isolado foi considerado promissor para aplicação industrial, por apresentar produção de PL e PG e baixa produção de celulasas, que não é desejável na indústria de têxteis. Além disso, as micotoxinas patulina, citrinina e ocratoxina A não foram detectadas no filtrado enzimático de *P. griseoroseum* nas condições de cultivo para a produção de PG e PL.

Nosso grupo tem estudado aspectos fisiológicos e genéticos da produção de PL e PG por *P. griseoroseum*. Foram construídos vetores de expressão para PL e PG, contendo as regiões codificadoras dos genes *plg1* e *pgg2*, respectivamente, sob o controle de um promotor forte e constitutivo.

Cada vetor foi utilizado, juntamente com o plasmídeo que contém o gene *niaD*, que codifica a nitrato redutase, para co-transformar a linhagem mutante *P. griseoroseum* PG63, a qual possui uma deleção de 122 pares de base nesse gene. As linhagens transformadas foram selecionadas por meio da avaliação do crescimento em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. As linhagens recombinantes superprodutoras de PG e PL foram selecionadas por meio da dosagem da atividade enzimática, e foram denominadas T146 e T105, respectivamente. A linhagem T146 cultivada em presença de sacarose apresentou aumento da produção de PG de até 12 vezes em relação à linhagem mutante PG63 cultivada em pectina e extrato de levedura. A linhagem T105 produziu 62 vezes mais PL quando cultivada em presença de caldo de cana, em relação à linhagem mutante PG63 cultivada em pectina e extrato de levedura.

Recentemente, o vetor contendo o gene *pgg2* foi utilizado, juntamente com o plasmídeo que contém o gene *hph*, que confere resistência à higromicina B, para co-transformar a linhagem T105. As linhagens transformadas foram selecionadas por meio da avaliação do crescimento em meio contendo higromicina B. Foi obtida uma linhagem recombinante de *P. griseoroseum*, denominada T20, com alta produção de PL e PG. Essa linhagem demonstrou um grande potencial para aplicação industrial, uma vez que apresentou simultaneamente aumentos na produção de PL e PG em relação à linhagem selvagem de *P. griseoroseum*, os quais foram similares aos observados nas linhagens T105 e T146, respectivamente. Adicionalmente, as enzimas PL e PG produzidas pelas linhagens de *P. griseoroseum* apresentam características físico-químicas diferenciais para o mercado, como maior estabilidade térmica e de armazenamento e pontos isoelétricos (pI) básicos, deduzidos a partir da seqüência dos genes *plg1* e *pgg2*. As preparações de pectinases disponíveis no mercado, que são produzidas por *Aspergillus* sp. apresentam PL e PG com pI na faixa de 6 a 7, enquanto que PL e PG produzidas pela linhagem recombinante T20 possuem pI deduzidos de 9,4 e 8,3, respectivamente. Essa característica possibilita atividade enzimática em ampla faixa de pH porque o uso de pectinases normalmente ocorre em meio ácido, como na indústria de sucos ácidos, e a produção de PL e PG por fungos filamentosos ocorre em meio de cultivo com pH inicial próximo da neutralidade, comumente na faixa de 6-7, tendendo à acidificação durante a fermentação.

Considerando o eficiente sistema de produção de pectinases da linhagem *P. griseoroseum* T20, este trabalho teve como objetivos otimizar a produção de PL e PG pela linhagem recombinante *P. griseoroseum* T20 em frascos com volume de trabalho de 200 mL, utilizando-se açúcar cristal como fonte de carbono; escalonar o processo de produção de PL e PG para biorreator com volume de 10 litros; caracterizar o crescimento e a morfologia da linhagem *P. griseoroseum* T20 e determinar os parâmetros cinéticos da fermentação.

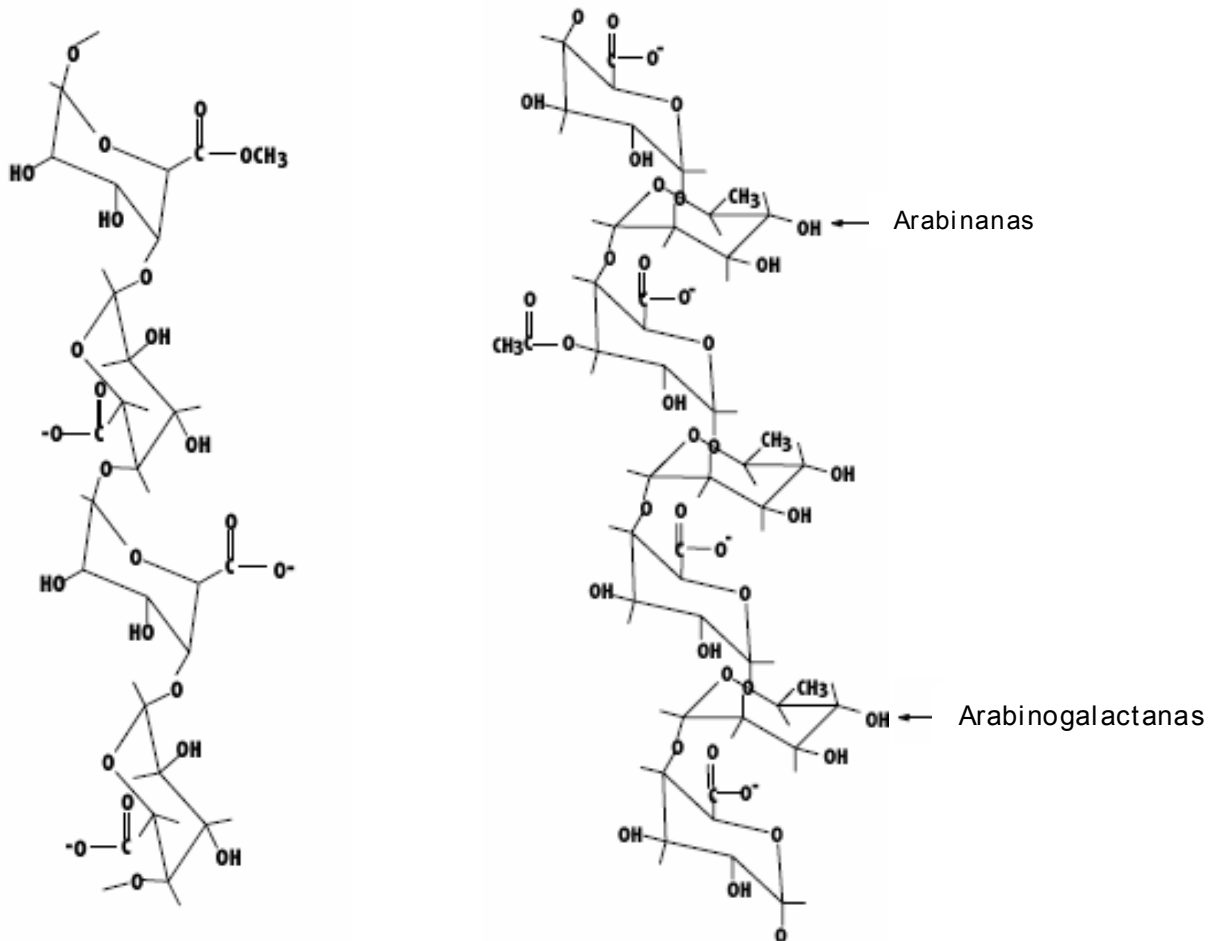
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Pectinas

A pectina é constituída por uma família de polissacarídeos complexos de alta massa molecular que contêm resíduos de ácido galacturônico ligados por ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas. As cadeias laterais da molécula de pectina consistem de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose. Os grupos carboxílicos do ácido galacturônico são parcialmente esterificados por grupos metil, e parcialmente ou completamente neutralizados por íons sódio, potássio ou amônio. As substâncias pécticas não possuem massa molecular definida, variando de 25 a 360 kDa. Três polissacarídeos pécticos principais são encontrados nas paredes celulares primárias de vegetais superiores: a homogalacturonana, a ramnogalacturonana I e a ramnogalacturonana II. A homogalacturonana é uma cadeia linear de resíduos de ácido D-galacturônico em que alguns dos grupos carboxil são esterificados por grupamentos metil. A ramnogalacturonana I é uma família de polissacarídeos que contêm um esqueleto principal do dissacarídeo [ $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -ácido-D-galacturônico-(1,2)- $\alpha$ -L-ramnose-(1 $\rightarrow$ )] e as ramnogalacturonana II são um grupo de polissacarídeos que contêm uma cadeia linear de resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações  $\alpha$ -1,4, apresentando como ramificações uma cadeia não-sacarídica e um octassacarídeo, ligados ao C-2 de alguns dos resíduos de ácido galacturônico da cadeia principal e dois dissacarídeos estruturalmente diferentes ligados ao C-3 da cadeia principal (Schols e Voragen, 1996; Jayani et al., 2005). A Figura 1 ilustra a estrutura básica dos principais polissacarídeos pécticos.

De acordo com o tipo de modificação da cadeia lateral da molécula de pectina, substâncias pécticas são classificadas em protopectina, ácido pectínico, ácido péctico e pectina, sendo essas três últimas total ou parcialmente solúveis em água. Protopectina é insolúvel em água e é a forma nativa unida com outros constituintes das células vegetais. Ácido péctico é uma designação aplicada a substâncias pécticas compostas de ácido poligalacturônico coloidal, em que os grupos carboxila estão essencialmente livres de grupos metil éster e seus sais são pectatos neutros ou ácidos. Ácido





**Figura 1.** Estrutura básica dos principais polissacarídeos pécicos. (A) Homogalacturonana, composto de unidades de ácido  $[1\rightarrow4]\alpha$ -D-galactopiranosilurônico, parcialmente esterificadas por grupos metil no C6. (B) Ramnogalacturonana I, composto de unidades repetidas dissacarídicas do ácido  $[1\rightarrow2]\alpha$ -D-galactosilurônico (GalA). As unidades de GalA podem ser acetiladas até álcoois secundários. Aproximadamente a metade das unidades dissacarídicas da ramnogalacturona I possuem cadeias laterais como arabinanas, arabinogalactanas e galactanas.

pectínico é um grupo de compostos contendo ácido poligalacturônico coloidal com poucos grupos metil éster. O termo geral pectina designa ácidos pectínicos solúveis em água, com grau variável de grupos metil éster e um grau de neutralização capaz de formar gel com açúcares e ácidos em condições adequadas (Schols e Voragen, 1996; Kashyap et al., 2001).

As substâncias pécticas estão presentes em maiores concentrações na lamela média da parede celular de vegetais superiores, mas também são comuns na parede celular primária e secundária, onde normalmente estão ligadas a microfibrilas de celulose e hemicelulose. Pectinas são, portanto, largamente distribuídas na natureza. A complexa estrutura das substâncias pécticas, juntamente com o grande número de genes envolvidos na sua biossíntese, sugere que esses polissacarídeos têm múltiplas funções no crescimento e no desenvolvimento de plantas, como por exemplo, na contribuição para rigidez e estrutura dos tecidos vegetais (Ridley et al., 2001; Gummadi e Kumar, 2005).

## 2.2. Enzimas pectinolíticas

As enzimas pectinolíticas catalisam a degradação dos polissacarídeos pécticos. Como existem diferentes estruturas de polissacarídeos pécticos presentes nas células vegetais, existe um complexo de enzimas pectinolíticas. As pectinases são classificadas em três tipos principais, com base em seu mecanismo de ação na degradação: 1) pectinesterases, que removem os grupos metil da pectina; 2) despolimerases (hidrolases e liases), que catalisam a clivagem das ligações glicosídicas das substâncias pécticas; e 3) protopectinases, que solubilizam a forma nativa insolúvel da pectina por meio de hidrólise para formar pectina (Kashyap et al., 2001). A Tabela 1 mostra a nomenclatura e a classificação das duas primeiras classes de enzimas, de acordo com a *Enzyme Commission* (EC), segundo as recomendações da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).

As enzimas pectinolíticas despolimerases são classificadas de acordo com: 1) a clivagem hidrolítica (hidrolases, que catalisam a hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,4) ou transeliminativa (liases, que catalisam a  $\beta$ -eliminação) das ligações glicosídicas; 2) os mecanismos endo (clivagem randômica) ou exo (clivagem a

**Tabela 1.** Nomenclatura e classificação de pectinases segundo a IUBMB.

Tipo de pectinase	Nome sugerido pela EC	Sigla	Nome comum	Número EC
Desesterificante	Polimetilgalacturonase esterase	PMGE	Pectina esterase	3.1.1.11
Hidrolase <sup>1</sup>	Endo poligalacturonase	endo-PG	Poligalacturonase	3.2.1.15
	Exo poligalacturonase 1	exo-PG 1	Poligalacturonase	3.2.1.67
	Exo poligalacturonase 2	exo-PG 2	Poligalacturonase	3.2.1.82
Liase	Endo poligalacturonase liase	endo-PGL	Pectato liase	4.2.2.2
	Exo poligalacturonase liase	exo-PGL	Pectato liase	4.2.2.9
	Endo polimetilgalacturonato liase	endo-PMGL	Pectina liase	4.2.2.10
	Exo polimetilgalacturonato liase	exo-PMGL	Pectina liase	–

<sup>1</sup> As hidrolases incluem, ainda, as polimetilgalacturonases (PMG), que foram aqui omitidas por apresentarem existência questionável.

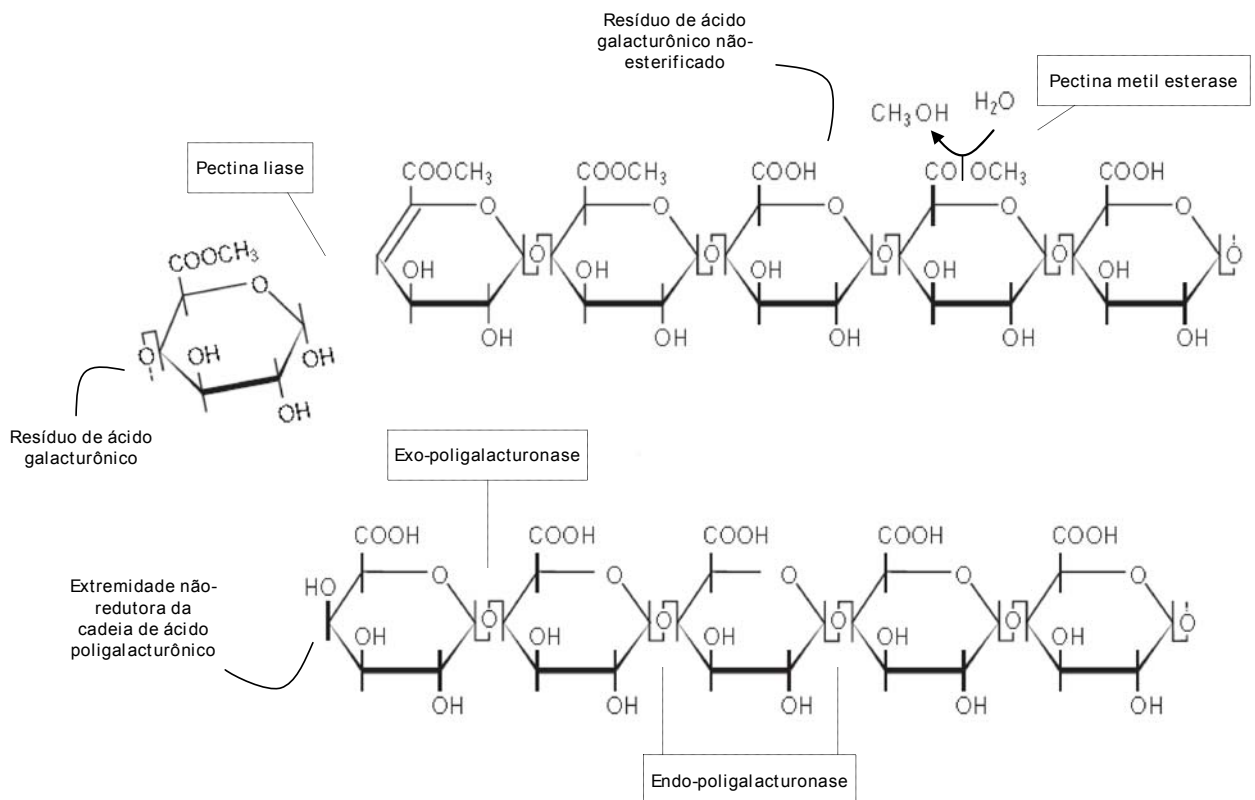
partir da extremidade não-redutora da cadeia de ácido poligalacturônico) de ação; e 3) a preferência por ácido pécico ou pectina como substrato (Jayani, 2005).

As poligalacturonases (PG) são hidrolases que catalisam a hidrólise seqüencial ou randômica das ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas entre dois resíduos de ácido galacturônico não esterificados. É a principal enzima com função hidrolítica, atuando sobre o ácido pécico (Benen et al., 1996). As pectina liases (PL) catalisam a  $\beta$ -eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico esterificados, clivando as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da porção aglicona da pectina, de modo endo ou exo. A atividade de pectina liase é considerada chave no processo de degradação da pectina porque a sua atuação não requer a ação prévia de outras enzimas do complexo pectinolítico (Albersheim, 1966). A Figura 2 ilustra a ação das principais classes de pectinases sobre os polissacarídeos pecticos.

As enzimas pectinolíticas apresentam expressiva aplicação industrial e ocupam cerca de 10% da produção mundial de preparações enzimáticas, sendo usadas em diferentes setores, como na indústria têxtil, de papel e celulose e de alimentos (Kashyap et al., 2001). Nesta última, pectinases têm sido utilizadas na cura do café, cacau e fumo, na clarificação de sucos de frutas e de vinhos, na manufatura de produtos hidrolisados da pectina, na extração do óleo de sementes oleaginosas e pigmentos, entre muitas outras aplicações (Carr, 1985; Rai et al., 2004; Radoi et al., 2005; Hadj-Taieb, et al., 2006; Choudhari e Ananthanarayan, 2007).

### 2.3. Sistemas de produção de pectinases

Considerando as aplicações das pectinases, foram desenvolvidas diversas estratégias para a produção dessas enzimas utilizando-se organismos procariotos e eucariotos. Fungos filamentosos são excelentes produtores de enzimas extracelulares, a exemplo de celulases, lacases, xilanases, fitases, galactosidases, catalases, lipases, amilases e pectinases (Baracat et al., 1989; Abou-Zeid, 1997; Shiba et al., 2001; Johnson et al., 2003; Vats et al., 2004; Chavez et al., 2006; Couto et al., 2007; Ikeda et al., 2007; Falkoski, et al, 2008).



**Figura 2.** Ação das principais classes de pectinases sobre os polissacarídeos pécnicos. As pectina liases clivam as ligações entre os resíduos de ácido galacturônico esterificados. As exo-poligalacturonases hidrolisam as ligações entre os resíduos de ácido poligalacturônico não-esterificados na extremidade não-redutora da cadeia de ácido poligalacturônico. As endo-poligalacturonases e as pectato liases hidrolisam e clivam, respectivamente, as ligações entre os resíduos não esterificados de ácido galacturônico. As pectina (metil) esterases catalisam a retirada de grupos metil dos resíduos esterificados de ácido galacturônico, com formação de metanol.

Esses microrganismos são capazes de secretar no meio extracelular grandes quantidades de enzimas, de efetuar modificações pós-traducionais como glicosilação, fosforilação e formação de pontes de enxofre e de serem cultivados em meios de baixo custo. Por essas razões, fungos filamentosos têm grande potencial para o melhoramento genético, por meio da sua utilização como hospedeiros de DNA recombinante (Wang et al., 2005).

A produção econômica e ambientalmente sustentável de enzimas de interesse industrial tem sido realizada de forma eficiente e segura, com o uso de microrganismos geneticamente modificados (MGM). As linhagens geneticamente modificadas têm tornado possível a produção de pectinases com maior especificidade e pureza, reduzindo a contaminação por proteínas indesejáveis, além da melhor utilização de matéria-prima e menor produção de resíduos (Stemke, 2004). O gênero *Aspergillus* tem sido o mais comumente utilizado para a obtenção de MGM visando à produção industrial de enzimas pectinolíticas (US6159718, US6602696, WO03012071), em especial a espécie *A. niger* (EP0278355, US2003032161).

Existem ainda na literatura relatos do melhoramento genético clássico de outros gêneros de fungos filamentosos para a produção de pectinases. Foi descrita a obtenção de uma linhagem mutante do fungo *Penicillium occitanis*, por meio de mutagênese induzida por ácido nitroso, a qual produz cerca de 50 vezes mais pectinases totais em relação à linhagem selvagem (Hadj-Taieb et al., 2002).

Nosso grupo iniciou estudos com pectinases a partir da bioprospecção visando à seleção de fungos produtores dessas enzimas. O trabalho permitiu o isolamento de espécies que foram analisadas quanto à produção de pectinases e celulases (Baracat et al., 1989).

O sistema de produção de pectinases por *Penicillium griseoroseum* e *Penicillium expansum* se mostrou interessante porque, nas condições testadas por Baracat et al. (1989), apresentou considerável atividade pectinolítica e baixa atividade celulolítica. A atividade celulolítica é indesejada na indústria têxtil. Além disso, não foi detectada a presença das micotoxinas patulina, citrinina e ocratoxina A na linhagem selvagem de *P. griseoroseum* nas condições de cultivo para produção de pectinases (Ferreira, 2000; Vivan, 2002; Visôto, 2003).

Ribon et al. (1999, 2002a) isolaram e caracterizaram dois genes (*pgg1* e *pgg2*) que codificam PG em *P. griseoroseum*. A região codificadora dos genes *pgg1* e *pgg2* possuem, respectivamente, 1.251 e 11.65 pares de base e ambas são interrompidas por dois íntrons. Um polipeptídeo de 376 aminoácidos foi deduzido a partir do seqüenciamento do gene *pgg1*, com um possível sítio de glicosilação (N<sup>307</sup>) e massa molecular predita de 38,4 kDa. A proteína deduzida de *pgg2* possui 369 aminoácidos, 38,3 kDa e dois potenciais sítios de glicosilação (N<sup>300</sup> e N<sup>338</sup>). A identidade entre as proteínas Pgg1 e Pgg2 foi de 57,5%. Com base nas seqüências de aminoácidos deduzidas, os pontos isoelétricos calculados das proteínas Pgg1 e Pgg2 foram de 5,31 e 8,31, respectivamente.

Ribon et al. (2002b) demonstraram que os dois genes que codificam poligalacturonases em *P. griseoroseum* são regulados em nível de transcrição e que o gene *pgg1* é transcrito apenas a partir de 76 h de cultivo, enquanto que o transcrito do gene *pgg2* é detectado em todos os tempos de cultivo avaliados (24 a 96 h). Transcritos do gene *pgg1* foram detectados apenas na presença de pectina, independentemente da adição de extrato de levedura. O gene *pgg2* foi transcrito na presença de pectina ou sacarose como fonte de carbono, sendo sua transcrição reprimida por glicose.

Bazzolli et al. (2006) isolaram e caracterizaram dois genes (*plg1* e *plg2*) que codificam PL em *P. griseoroseum*. A região estrutural do gene *plg1* possui 1.341 pares de bases e é interrompida por dois íntrons. A proteína Plg1 deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos possui 374 aminoácidos, com massa molecular estimada em 40,1 kDa, um potencial sítio de glicosilação na posição N<sup>112</sup> e *pl* calculado de 9,46. O gene *plg2* possui 1.400 pares de bases, sendo interrompido por quatro íntrons. A proteína Plg2 deduzida possui 383 resíduos de aminoácidos, massa molecular estimada de 40,5 kDa e *pl* de 5,55. Três possíveis sítios de glicosilação foram encontrados nas posições N<sup>38</sup>, N<sup>128</sup> e N<sup>257</sup>.

Bazzolli et al. (2006) estudaram a expressão dos genes *plg1* e *plg2* de *P. griseoroseum* e verificaram que, em ambos os genes, ela é controlada por repressão catabólica. O maior acúmulo do transcrito do gene *plg1* foi detectado quando o fungo foi cultivado em meio contendo pectina cítrica. Na ausência do indutor natural, a pectina, sacarose suplementada com extrato de levedura foi capaz de induzir a expressão do gene *plg1*, mas não do gene *plg2*, que se

manteve em níveis basais de expressão. Foi observado que a expressão de ambos os genes reduziu substancialmente quando o fungo foi cultivado em presença de glicose ou outros açúcares simples, evidenciando o efeito da repressão catabólica.

O *pl* deduzido das proteínas Plg1 e Pgg2, maiores do que da Plg2 e Pgg1, é uma característica importante para aplicação industrial dessas enzimas, considerando principalmente o meio de cultivo ácido e a indústria de sucos de frutas ácidas, o que possibilita atividade enzimática em uma ampla faixa de pH.

Visando à obtenção de linhagens melhoradas para aumentar a produção das enzimas pectinolíticas, Ribeiro (2005) e Cardoso et al. (2008) construíram vetores de expressão para aumentar a produção de PL e PG. O vetor pAN52*plg1* contém a região codificadora do gene e *plg1* sob o controle do promotor forte e constitutivo do gene *gpd*, que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase da via glicolítica, e a região de terminação do gene *trpC*, que codifica a enzima indolglicerol fosfato sintase envolvida na biossíntese de triptofano, ambos de *Aspergillus nidulans*. O vetor pAN52*pgg2* contém a região codificadora do gene *pgg2* submetida ao mesmo controle do vetor pAN52*plg1*. Cada vetor foi utilizado, juntamente com o plasmídeo pNPG1, para co-transformar a linhagem mutante *P. griseoroseum* PG63 (Pereira et al., 2004), a qual possui uma deleção de 122 pares de base nesse gene. O plasmídeo utilizado na co-transformação (pNPG1) contém o gene que codifica a nitrato redutase (*niaD*) de *P. griseoroseum*, restaurando o fenótipo selvagem por complementação da mutação no gene *niaD*. As linhagens transformadas foram selecionadas por meio da avaliação do crescimento em meio contendo nitrato como única fonte de nitrogênio. As linhagens recombinantes superprodutoras de PL e PG foram selecionadas por meio da dosagem da atividade enzimática, e foram denominadas T105 e T146, respectivamente.

Os mesmos autores caracterizaram as linhagens recombinantes T105 e T146 quanto à estabilidade mitótica e ao padrão de integração dos vetores no genoma. Ambas as linhagens mostraram-se mitoticamente estáveis. A linhagem *P. griseoroseum* T105 apresentou duas cópias adicionais do gene *plg1* no genoma, enquanto que a linhagem *P. griseoroseum* T146 apresentou apenas uma cópia adicional do gene *pgg2* (Ribeiro, 2005; Teixeira, 2007; Cardoso, 2008).



A produção de PL e PG pelas linhagens recombinantes T105 e T146, respectivamente, foi também verificada. A linhagem T146 cultivada em presença de sacarose apresentou aumento da produção de PG de até 12 vezes em relação à linhagem mutante PG63 cultivada em pectina e extrato de levedura. A linhagem T105 produziu 62 vezes mais PL quando cultivada em meio de cultura contendo caldo de cana como fonte de carbono, em relação à linhagem selvagem de *P. griseoroseum* cultivada em meio de cultura adicionado de pectina e extrato de levedura (Ribeiro, 2005; Cardoso, 2008).

Recentemente, foi obtida uma linhagem geneticamente modificada, denominada *P. griseoroseum* T20, a partir da co-transformação da linhagem recombinante T105 (Teixeira, 2007) utilizando os plasmídeos pAN52

gg2 e pAN7.1. O plasmídeo pAN7.1 contém o gene *hph* que codifica a proteína higromicina B fosfotransferase, que confere resistência à higromicina B, sendo usado como marcador de seleção. As linhagens transformadas foram selecionadas por meio da avaliação do crescimento em meio contendo higromicina B. As linhagens recombinantes superprodutoras de PL e PG simultaneamente foram selecionadas por meio da dosagem da atividade de ambas as enzimas.

A linhagem recombinante T20 mostrou-se mitoticamente estável, apresentando duas cópias adicionais do gene *plg1* e apenas uma cópia adicional do gene *pgg2* no genoma (Teixeira, 2007; Cardoso, 2008). A linhagem *P. griseoroseum* T20 mostrou aumentos de 45 e 12 na produção de PL de 45 vezes e de PG de 11 vezes, quando cultivada em caldo de cana, em relação à linhagem selvagem de *P. griseoroseum* cultivada em pectina e extrato de levedura.

#### 2.4. Otimização da produção de pectinases

A otimização dos processos biotecnológicos visa encontrar condições que demandem redução de custos operacionais de produção e que proporcionem maiores rendimento e produtividade do produto de interesse. No caso da produção de enzimas por microrganismos, essas condições podem ser proporcionadas pela utilização de substratos acessíveis e provenientes de subprodutos de outros processos, bem como a utilização de linhagens

superprodutoras da enzima de interesse (Piccoli-Valle et al. 2001a; Danesi, 2006; Camassola, et al, 2007).

A produção industrial de enzimas tem sido feita principalmente pelo processo de fermentação submersa. Esse sistema tem vantagens como a maior homogeneidade, a transferência de calor e massa mais eficientes e o monitoramento e controle de parâmetros facilitados. Entretanto, nos países orientais emprega-se tradicionalmente a fermentação semi-sólida e, mesmo no Brasil, há uma tendência atual de utilização desse sistema, dada a possibilidade de utilização de resíduos agro-industriais de baixo custo. Suas vantagens incluem o menor risco de contaminação, a menor necessidade de espaço e a obtenção de enzimas extracelulares mais concentradas (Bianchi et al., 2001).

A fermentação submersa para a produção de enzimas por fungos filamentosos envolve o cultivo do microrganismo em meio líquido, normalmente com elevadas concentrações de oxigênio. Nesses sistemas, o crescimento e a produção são afetados por diversos parâmetros, como a composição do meio de cultivo, a quantidade de inóculo, o pH, a temperatura, a agitação e a aeração, entre outros. A otimização de processos fermentativos de fungos filamentosos, assim como sua transferência para maiores escalas, representam um desafio devido à grande variação em sua morfologia, em relação às culturas unicelulares (Wang et al. 2005).

Cardoso (2004) estudou algumas condições que influenciam a produção de PL pela linhagem recombinante *P.griseoroseum* T105 cultivada em 50 mL de meio contendo glicose como fonte de carbono. A atividade de PL foi avaliada em diferentes quantidades de inóculo, de  $10^5$  a  $10^7$  conídios/mL, concentração de glicose, 2,0 a 10 g/L e tempo de cultivo, de 12 a 120h. As melhores condições dentre as testadas para produção de PL foram  $10^6$  conídios/mL, 10 g/L de glicose e 48h de cultivo. O cultivo da linhagem recombinante T105 também foi estudado nos biorreatores BioFlo III e BioFlo IV New Brunswick Scientific, com o volume de trabalho de 2,5 e 10 L, respectivamente. Teixeira (2004) observou alta atividade de PL quando a linhagem recombinante T105 foi cultivada em sacarose, açúcar comercial ou caldo de cana. Foram testadas diferentes agitações no biorreator, de 200 a 500 rpm. A melhor condição de aeração testada para a produção de PL foi de 200

rpm. Gonçalves (2006) avaliou as condições de aeração de 0,2 a 3,0 vvm. A melhor aeração avaliada para a produção de PL foi de 0,2 vvm.

Ribeiro (2005) avaliou as condições de cultivo concentração de glicose e fonte de carbono para a produção de PG pela linhagem recombinante *P.griseoroseum* T146, cultivada em 50 mL de meio. As concentrações de glicose testadas foram de 5,0 a 20 g/L de glicose e as fontes de carbono avaliadas foram glicose, glicose e extrato de levedura, caldo de cana e sacarose. A melhor concentração de glicose observada foi de 10 g/L e as fontes de carbono avaliadas não apresentaram diferença significativa na produção de PG.

A produção industrial de enzimas pode ser feita por processo descontínuo, semidescontínuo, descontínuo alimentado e contínuo. O processo contínuo é, sem dúvida, o que resulta em maior produtividade, em razão da manutenção das células em um mesmo estado fisiológico. Há nesse caso uma menor necessidade de mão-de-obra. Entretanto, algumas desvantagens desse processo o tornam menos utilizado industrialmente. Entre elas, destaca-se o maior investimento inicial na planta industrial, a maior possibilidade de ocorrência de contaminações e mutações genéticas espontâneas. O processo fermentativo mais utilizado industrialmente é, portanto, o descontínuo, também chamado de batelada. Esse processo apresenta uma série de vantagens, como por exemplo, o menor risco de contaminação, a menor propensão à mutação genética, além do fato de ela ser mais adequada quando a formação de produtos não é associada ao crescimento. Além dos sistemas contínuos e de batelada, a cultura em batelada alimentada tem sido usada para a produção de vários bioprodutos, como metabólitos primários e secundários, proteínas e polímeros. A batelada alimentada é adequada quando mudanças nas concentrações de nutrientes afetam a produtividade e o rendimento do produto desejado, como no caso de inibição por substrato. O processo descontínuo simples se torna bem caracterizado quando existe o conhecimento básico da cinética do processo, que, por esse motivo, é de extremo interesse. Portanto, não se recomenda o estudo dos processos alternativos sem que se domine razoavelmente o descontínuo (Schmidell et al., 2001).

Existem duas maneiras pelas quais se otimizam os parâmetros de um processo fermentativo que afetam o crescimento microbiano e a produção do produto de interesse: o método clássico e o método estatístico. O método

clássico é baseado no estudo de um fator por vez, ou seja, uma variável independente é estudada, enquanto todos os outros fatores são mantidos constantes, isto é, em um nível fixo. Esse método pode levar a resultados irreais e a conclusões incorretas. Além do mais, o método clássico não garante a determinação das condições ótimas, não detecta as freqüentes interações que ocorrem entre dois ou mais fatores e é mais trabalhoso e oneroso. A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM), por sua vez, é um método estatístico que usa dados quantitativos, a partir de um planejamento experimental adequado, para determinar e simultaneamente resolver equações multivariadas. Esse método representa um conjunto de técnicas estatísticas para planejamentos experimentais, construindo modelos, avaliando o efeito de fatores e analisando as condições ótimas dos fatores para as respostas desejadas (Box e Wilson, 1951). A RSM tem sido utilizada com sucesso para otimizar composição de meios de cultivo (Cui, et al., 2006; Zhang, et al., 2006), condições de hidrólise enzimática (Kunamneni e Singh, 2005; Nilsang, et al., 2005), parâmetros para síntese de polímeros (Shieh e Lai, 2000), parâmetros para processamento de alimentos (Castro et al., 2000; Ozer, et al., 2004), entre outros.

Muitos trabalhos clássicos para a otimização da produção de pectinases têm sido conduzidos (Piccoli-Valle et al. 2001b; Kapoor e Kuhad, 2002; Patil e Dayanand, 2006; Gummadi e Kumar, 2008). Entretanto, até agora pouco se foi estudado para a otimização de pectinases utilizando-se a RSM.

## 2.5. Cinética de processos fermentativos

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Entendem-se como componentes o microrganismo (ou biomassa), os produtos de interesse econômico e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultivo. O estudo cinético é de grande importância para a otimização da produção e aumento de escala de biorreatores, uma vez que os perfis cinéticos bem definidos são o ponto de partida para a descrição quantitativa de uma fermentação, como por exemplo, a identificação da duração do processo. A

comparação quantitativa entre diferentes condições de cultivo como pH, temperatura, agitação e aeração se torna possível com a utilização dos parâmetros cinéticos de velocidade de transformação e de fatores de conversão. Os valores obtidos da cinética representam as informações necessárias para dimensionamento de uma instalação industrial de produção durante o escalonamento (Hiss, 2001).

Normalmente, os modelos cinéticos envolvem a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) como uma função da concentração de substrato (S), produto (P) e biomassa (X). Eles podem descrever o rendimento, quando correlacionam a conversão de substratos em produtos por meio das concentrações conhecidas dos metabólitos, ou podem descrever a produtividade, quando correlacionam o produto e o tempo gasto para sua produção. Em muitos processos, a formação do produto está relacionada com o crescimento da biomassa. Entretanto, a formação de produtos por fungos filamentosos e seu crescimento estão associados com um processo complexo e não completamente conhecido. A estrutura multicelular do micélio, a heterogeneidade morfológica e as diferenças no comprimento da hifa, ao longo de um processo fermentativo, fazem com que se torne difícil construir modelos matemáticos para descrever o crescimento de fungos filamentosos em tais sistemas (Papagianni, 2004; Tavares, 2006).

## 2.6. Mercado de enzimas

A tecnologia enzimática vem sendo utilizada em diversos setores industriais em processos tradicionais da indústria de alimentos e da indústria química, possibilitando a obtenção de produtos com maior valor agregado e qualidade, obtidos por processos com menor consumo energético e de menor impacto ambiental (Bon, 2008).

O mercado mundial de enzimas industriais é estimado em US\$ 2,3 bilhões ao ano, correspondendo a aproximadamente 60% do mercado total de enzimas e tende a crescer a uma taxa entre 5,7 e 10% ao ano. Em 2005, o mercado externo brasileiro de enzimas industriais foi de US\$ 47 milhões, correspondendo a 2,0% do mercado mundial. Em 2005, o Brasil importou US\$ 100 milhões em enzimas, e, dentre estas, US\$ 31 milhões de enzimas

industriais. Nesse mesmo ano, exportou US\$ 3 milhões de enzimas industriais (Bon, 2008).

Três segmentos englobam o mercado mundial de enzimas: 1) as destinadas à indústria têxtil e de produtos de limpeza; 2) enzimas para ração animal, com crescimento acelerado devido ao grande interesse dos criadores de aves e suínos em aumentar o valor nutricional da ração e facilitar sua digestibilidade; e 3) enzimas para alimentos e bebidas, que estão em constante crescimento em razão da procura de novas aplicações na área de laticínios e panificação, e do crescente consumo de alimentos e bebidas (Costa, 2006).

As pectinases se enquadram no crescimento do último grupo, e movimentam no Brasil aproximadamente R\$ 6 milhões por ano. Tem-se observado, nos últimos anos, um aumento considerável da produção de sucos de frutas, o que leva ao aumento da demanda de enzimas pécicas. A exportação brasileira de sucos de frutas em 2005 aumentou 679,9 % em relação a 2000 (Pimenta, 2006).

A produção de pectinases tem grande potencial para se realizar no Brasil, uma vez que não há produção nacional. Nosso mercado é dependente do produto importado e o preço por litro de enzimas pectinolíticas importadas pode chegar a R\$ 7,5 mil (Pimenta, 2006).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, do Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

#### 3.1. Microrganismos utilizados

A linhagem recombinante *Penicillium griseoroseum* T20 foi utilizada para o estudo das condições de produção de PL e PG. As linhagens de *P. griseoroseum* CCT6421, PG63, T105 e T146 foram utilizadas como controle. A Tabela 2 apresenta a descrição das características de cada linhagem.

#### 3.2. Manutenção dos estoques das culturas e obtenção do inóculo de trabalho

As linhagens listadas na Tabela 2 foram ativadas a partir dos estoques, para posterior pré-cultivo em meio sólido para a obtenção dos inóculos. As linhagens selvagem, mutante PG63 e recombinantes foram cultivadas a 25°C por sete dias, em placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA). Após esse período, para obtenção do inóculo, os conídios foram raspados da superfície do meio sólido e colocados em solução de Tween 80 a 0,2 % (v/v) estéril. Posteriormente, a solução de Tween contendo os conídios foi homogeneizada, filtrada em gaze e diluída.

#### 3.3. Cultivo em fermentação submersa

##### 3.3.1 Fermentação em frascos Erlenmeyer

As linhagens foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com volume de trabalho de 200 mL. A quantidade inicial de inóculo foi de  $10^6$  conídios por mililitro de meio de cultivo. A temperatura e agitação foram mantidas constantes a 25°C e 150 rpm, respectivamente. O pH inicial do meio de cultivo foi de 6,8. O cultivo das linhagens ocorreu durante o tempo máximo de 120 horas, sendo as unidades experimentais coletadas a cada 24 horas. As linhagens foram cultivadas em meio mínimo tamponado, composto por  $K_2HPO_4$  6,98 g L<sup>-1</sup>;  $KH_2PO_4$  5,44 g L<sup>-1</sup>;  $(NH_4)_2SO_4$  1,0 g L<sup>-1</sup>,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1,1 g L<sup>-1</sup> e pela fonte de carbono.

**Tabela 2.** Linhagens de *Penicillium griseoroseum* utilizadas neste trabalho.

Linhagem	Características	Referência
<i>P. griseoroseum</i> CCT6421	Linhagem selvagem	Isolado na Universidade Federal de Viçosa
<i>P. griseoroseum</i> PG63 <i>nia<sup>-</sup></i>	Linhagem mutante espontâneo com uma deleção de 122 pb no gene <i>niaD</i> , que codifica a nitrato redutase ( <i>niaD</i> ).	Pereira et al. (2004)
<i>P. griseoroseum</i> T105	Linhagem recombinante com maior produção de PL. Possui cópias adicionais do gene <i>plg1</i> (PL), sob o controle do promotor forte e constitutivo do gene <i>gpd</i> e a região de terminação do gene <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i> .	Cardoso et al. (2008) Araújo et al. (2005) PI 0502515-0
<i>P. griseoroseum</i> T146	Linhagem recombinante com maior produção de PG. Possui cópias adicionais do gene <i>pgg2</i> (PG), sob o controle do promotor forte e constitutivo do gene <i>gpd</i> e a região de terminação do gene <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i> .	Ribeiro (2005) Araújo et al (2007) PI 0705573-0
<i>P. griseoroseum</i> T20	Linhagem recombinante com maior produção de PL e PG. Possui cópias adicionais dos genes <i>plg1</i> (PL) e <i>pgg2</i> (PG), ambos sob o controle do promotor forte e constitutivo do gene <i>gpd</i> e a região de terminação do gene <i>trpC</i> de <i>A. nidulans</i> .	Teixeira (2007) Araújo et al (2007) PI 0705573-0.



As linhagens recombinantes foram cultivadas em açúcar cristal comercial Alvino<sup>®</sup> nas concentrações de 5, 10, 15, 20 e 30 g/L. As linhagens selvagem e mutante PG63 foram cultivadas em meio mínimo contendo açúcar cristal 15 g/L e extrato de levedura 0,6 g/L. O meio de cultivo contendo o microrganismo foi filtrado em peneira de 400 malhas/pol<sup>2</sup> (37 µm de poro) e armazenado a -20°C, e o micélio foi utilizado para se determinar a massa seca.

### 3.3.2 Fermentação em biorreator

A linhagem recombinante *P. griseoroseum* T20 foi cultivada em biorreator New Brunswick BioFlo IV<sup>®</sup> 20L, com volume de trabalho de 10 L. O meio de cultivo e as condições de temperatura, tempo de cultivo e amostragem foram os mesmos utilizados nos frascos Erlenmeyer.

O cultivo das linhagens ocorreu durante o tempo máximo de 120 horas, sendo que a cada 24 horas foi feita coleta de 50 mL da cultura em biorreator.

### 3.4. Planejamento experimental

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) foi utilizada para otimizar as condições de produção de pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG) pela linhagem *P. griseoroseum* T20 cultivada em frascos Erlenmeyers de 500 mL, com o volume de trabalho de 200 mL de meio de cultivo contendo açúcar cristal como fonte de carbono. Um planejamento fatorial completo 5<sup>2</sup> foi usado. As variáveis independentes estudadas foram a concentração da fonte de carbono ( $X_1$ ) e o tempo de cultivo ( $X_2$ ), resultando em 35 unidades experimentais. As variáveis resposta foram definidas como produção de pectina liase ( $Y_1$ ) e de poligalacturonase ( $Y_2$ ). Foi definido um ponto em que  $X_1 = 10$  g/L, e neste foram realizadas três repetições. A agitação e a temperatura foram mantidas constantes em 150 rpm e 25°C, respectivamente. A Tabela 3 mostra o planejamento com os fatores e seus respectivos níveis.

A Equação 1 descreve o modelo de regressão utilizado no planejamento fatorial, incluindo os termos da interação:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

**Tabela 3.** Fatores e níveis estudados visando à otimização da produção de PG e PL pela linhagem *P. griseoroseum* T20.

Fatores	Símbolo e unidade da variável	Níveis				
Concentração de sacarose	$X_1$ (g/L)	5,0	10	15	20	30
Tempo	$X_2$ (h)	24	48	72	96	120

onde  $Y$  é a variável resposta predita, sendo  $Y_1$  referente à produção de PL e  $Y_2$  referente à produção de PG,  $\beta_0$  é o coeficiente de interceptação,  $\beta_i$  são os coeficientes dos efeitos lineares,  $\beta_{ij}$  são os coeficientes dos efeitos quadráticos,  $\beta_{ij}$  são os coeficientes dos efeitos de interação e  $x_i$  e  $x_j$  são as variáveis independentes concentração da fonte de carbono e tempo de cultivo, respectivamente.

O teste  $t$  de Student permitiu determinar a significância estatística dos coeficientes da regressão. O teste Fisher para a análise da variância (ANOVA) foi realizado nos dados experimentais para avaliar a significância estatística do modelo. As análises de regressão e a construção dos gráficos foram realizadas utilizando-se o software estatístico MINITAB® (versão demo 15, Minitab Inc.).

Esse mesmo experimento foi utilizado para se estudar o crescimento micelial e a influência dos fatores concentração de sacarose e tempo na produção de biomassa. A variável resposta foram definidas como produção de pectina liase ( $Y_1$ ) e de poligalacturonase ( $Y_2$ ). Foram utilizadas duas repetições no ponto  $X_1 = 10$  g/L, resultando em 30 unidades experimentais.

### 3.5. Parâmetros cinéticos

Os parâmetros produtividade em biomassa ( $Pd_x$ ) e produtividade enzimática ( $Pd_P$ ), foram calculados de acordo com as Equações 2 e 3, respectivamente:

$$Pd_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad (2)$$

$$Pd_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad (3)$$

onde  $\Delta X = (X_{\max} - X_i)$ ,  $X_{\max}$  é a máxima biomassa (g/L),  $X_i$  é a biomassa inicial (g/L),  $\Delta P = (P_{\max} - P_i)$ ,  $P_{\max}$  é a máxima atividade enzimática (U/mL),  $P_i$  é a atividade enzimática inicial (U/mL),  $\Delta t = (t_f - t_i)$ ,  $t_f$  é o tempo (h) correspondente à máxima biomassa ou atividade enzimática,  $t_i$  é o tempo inicial de cultivo (h).

A atividade enzimática específica em relação à biomassa ( $P_{specM}$ ) e a atividade enzimática específica em relação à proteína total ( $P_{specP}$ ) foram calculadas de acordo com as Equações 4 e 5, respectivamente:

$$P_{specM} = \frac{P_{\max}}{X_t} \quad (4)$$

$$P_{specP} = \frac{P_{\max}}{Q_t} \quad (5)$$

onde  $X_t$  é a biomassa no tempo  $t$ , quando  $P_{\max}$  foi observada, e  $Q_t$  é a proteína total no tempo  $t$ , quando  $P_{\max}$  foi observada.

Os fatores de conversão de substrato em biomassa ( $R_{X/S}$ ) e substrato em produto ( $R_{P/S}$ ) foram calculados utilizando-se as Equações 6 e 7, respectivamente:

$$R_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (6)$$

$$R_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} \quad (7)$$

onde  $\Delta X = (X_{\max} - X_i)$ ,  $X_{\max}$  é a máxima biomassa (g/L),  $X_i$  é a biomassa inicial (g/L),  $\Delta P = (P_{\max} - P_i)$ ,  $P_{\max}$  é a máxima atividade enzimática (U/mL),  $P_i$  é a atividade enzimática inicial (U/mL),  $\Delta S = (S_f - S_i)$ ,  $S_f$  é a concentração de substrato (g/L) correspondente à máxima biomassa ou atividade enzimática,  $S_i$  é a concentração inicial de cultivo (g/L).

### 3.6. Procedimentos analíticos

#### 3.6.1. Ensaio enzimáticos de pectina liase, poligalacturonase, protease e $\beta$ -glicosidade

Os filtrados das culturas foram utilizados para dosagem da atividade de pectina liase (PL), poligalacturonase (PG), protease e  $\beta$ -glicosidade.

A atividade de PL foi determinada por método espectrofotométrico a 235 nm, conforme descrito por Albersheim e Killias (1962). A mistura de reação foi constituída por 1 mL de pectina cítrica P-9135 (Sigma<sup>®</sup>) a 25 g/L em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mmol/L, pH 6,8 e 1,5 mL do filtrado da cultura, e mantida a 40°C. Alíquotas de 0,5 mL da mistura de reação foram retiradas nos tempos zero e 30 minutos de incubação e adicionadas em 4,5 mL de HCl 0,01 mol/L, para interrupção da reação. Uma unidade de atividade de PL foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um nanomol de  $\Delta^{4,5}$  galacturonídeo por minuto, utilizando-se o coeficiente de extinção molar 5550  $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$  para o cálculo (Albersheim, 1966).

A atividade de PG foi determinada baseando-se na dosagem de açúcar redutor, segundo o método do DNS (ácido dinitrossalicílico) descrito por Miller (1959). A mistura de reação foi constituída por 1,5 mL de ácido poligalacturônico 13 g/L P-3889 (Sigma<sup>®</sup>) (p/v) em tampão acetato de sódio pH 4,8, NaCl a 2,5 mol/L e 0,5 mL do filtrado da cultura, e mantida a 40°C. Alíquotas de 0,125 mL foram retiradas nos tempos zero e 20 minutos e adicionadas em 0,5 mL de solução de DNS (ácido 3,5 dinitrosalicílico a 10 g/L, NaOH a 16 g/L, tartarato duplo de sódio e potássio a 300 g/L), interrompendo a reação. Uma curva-padrão de ácido galacturônico foi construída com as leituras da absorvância de soluções de ácido galacturônico nas concentrações de zero até 270  $\mu\text{mol/L}$ . Uma unidade de atividade de PG foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um micromol de ácido galacturônico por minuto.

A atividade de protease foi medida utilizando-se azocaseína de acordo com Rajmohan et al. (2002), com modificações. A mistura de reação foi constituída por 0,1 mL do filtrado da cultura adicionado a 0,5 mL de solução de azocaseína a 5 g/L em tampão citrato 0,1 mol/L, pH 6,0. Após incubação a 37°C durante 2 horas e 30 minutos, a reação foi interrompida com 1,0 mL de ácido tricloroacético a 100 g/L, seguindo-se incubação em gelo durante 15

minutos. As amostras foram clarificadas por centrifugação a 5.000 g durante 10 minutos e a absorvância lida a 366 nm. O controle da reação foi realizado com azocazeína e tampão citrato. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como o aumento de uma unidade na absorvância a 366 nm por minuto de reação, sob as condições descritas. Foi construída uma curva-padrão, utilizando-se Protease P-5147 (Sigma<sup>®</sup>) na concentração-estoque de 20 mg/mL.

A atividade de  $\beta$ -glicosidade foi avaliada utilizando-se o substrato p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (Sigma<sup>®</sup>). A mistura de reação foi constituída por 0,6 mL de tampão ácido acético-acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 5,5, 150  $\mu$ L do filtrado da cultura e 250  $\mu$ L de solução de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo 2 mmol.L<sup>-1</sup>. Após incubação a 40°C durante 20 minutos, a reação foi interrompida com 1,0 mL de carbonato de sódio 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, e a absorvância lida a 410 nm. Uma curva-padrão de p-nitrofenol foi construída com as leituras da absorvância de soluções de p-nitrofenol nas concentrações de zero a 0,15  $\mu$ mol/L. Uma unidade de atividade de  $\beta$ -glicosidade foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um micromol de  $\beta$ -glicosidade por minuto de reação.

### 3.6.2. Determinação de proteína total no filtrado da cultura.

A quantificação do teor de proteína total no filtrado da cultura foi realizada por meio dos métodos de Bradford (Bradford, 1976) e do ácido bicinconínico (Smith et al., 1985), utilizando-se albumina de soro bovino para a construção da curva-padrão.

### 3.6.3. Avaliação do crescimento micelial

A produção de massa micelial foi quantificada após filtração do meio de cultivo contendo o microrganismo em peneira de 400 malhas/pol<sup>2</sup> (37  $\mu$ m de poro), seguida de lavagem em água destilada. O micélio foi transferido para recipiente de papel-alumínio e seco a 105°C até a obtenção de massa constante (Calam, 1969).

A morfologia micelial foi avaliada por meio de fotografias em Lupa Olympus SZX9, com equipamento digital de captura de imagem.

### 3.7. Avaliação do perfil protéico extracelular

As amostras foram preparadas a partir da diálise do filtrado da cultura em membranas de porosidade de 12 kDa (Sigma®). Posteriormente, o dialisado foi concentrado utilizando-se três volumes de acetona para cada volume da amostra. Após 12 horas prosseguiu-se à centrifugação a 10.000 g e o precipitado foi ressuspendido em 50 µL de água miliQ®. A quantidade de proteína total do extrato aplicada ao gel foi de 10 µg. Utilizaram-se 5 µg do marcador de massa molecular de proteínas médio, Promega (14,4-97,4 kDa) 0,5mg/mL.

O perfil protéico extracelular foi visualizado por meio de SDS-PAGE. O gel de separação foi composto de acrilamida a 12,5%, Tris-HCl pH 8,8, 375 mmol/L, SDS a 0,1%, persulfato de amônio 0,06% e TEMED, 0,05% e o gel empilhador foi composto por acrilamida 4%, Tris-HCl pH 6,8 140 mmol/L, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,05% (Laemmli, 1970). O tampão de amostra, constituído de Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8,8, uréia 6M, azul de bromofenol 0,1%, SDS 2,0% e glicerol 30%, foi adicionado às amostras, aquecendo-se a mistura por 10 minutos a 100°C antes de serem aplicadas ao gel. A eletroforese foi realizada à 60 volts por 4 horas em tampão de corrida constituído por Tris-HCl 72 mmol/L pH 8,5, glicina 576 mmol/L e SDS 0,24%. O gel foi corado com solução de metanol 45%, ácido acético 9,0% e Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1%, durante 2 horas e descorado com solução de ácido acético 7,5% e metanol 25%, durante 12 horas à temperatura ambiente.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Otimização da produção de pectina liase e poligalacturonase usando a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)

A RSM foi utilizada para a otimização das condições de fermentação da linhagem recombinante *Penicillium griseoroseum* T20 para maior produção de pectina liase e poligalacturonase.

A Tabela 4 representa a matriz do planejamento experimental com as variáveis resposta obtidas experimentalmente. Os resultados mostram uma considerável variação na produção de pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG) em função dos níveis utilizados das variáveis independentes.

Com o objetivo de ajustar um modelo matemático que permita estimar a produção de PL conforme a concentração da fonte de carbono e o tempo de cultivo, os dados experimentais foram submetidos a análises estatísticas de regressão múltipla e permitiram ajustar duas equações polinomiais de segundo grau.

A Equação 8 foi ajustada para explicar a produção de PL, e a Equação 9 para explicar a produção de PG:

$$Y_1 = -1185 + 195X_1 + 47,8X_2 - 6,19X_1^2 - 0,275X_2^2 \quad (8)$$

$$Y_2 = -3522 + 310X_2 - 1,85X_2^2 \quad (9)$$

onde  $Y_1$  e  $Y_2$  são as respostas estimadas produção de PL e PG, respectivamente, e  $X_1$  e  $X_2$  são os valores de concentração de sacarose e de tempo de cultivo.

A significância estatística das Equações 8 e 9 foi verificada pelo teste  $F$  e a análise de variância para o modelo quadrático da superfície de resposta é mostrada na Tabela 5. Em um nível de 95% de confiança, os modelos para produção de PL e PG apresentaram um  $F$ -value calculado maior que o tabelado (Box e Wilson, 1951). Pôde-se observar que ambos os modelos de regressão foram significativos.

**Tabela 4.** Matriz do planejamento fatorial completo para a produção de PL e PG. As variáveis independentes estudadas foram concentração de sacarose ( $X_1$ ) e tempo de cultivo ( $X_2$ ).

Unidades experimentais	Níveis		Produção de PL (U/mL)		Produção de PG (U/mL)	
	$X_1$ (g/L)	$X_2$ (h)	Experimental	Estimada	Experimental	Estimada
1	5,0	24	388	622	3844	2859
2	5,0	48	1437	1294	6166	7104
3	5,0	72	1093	1648	8489	9214
4	5,0	96	1017	1686	10312	9187
5	5,0	120	288	1406	7347	7025
6	10	24	332	1131	3074	2859
7	10	48	2142	1803	13623	7104
8	10	72	1582	2157	14726	9214
9	10	96	2258	2195	16882	9187
10	10	120	1638	1915	15317	7025
11	10	24	1425	1131	918	2859
12	10	48	2615	1803	2227	7104
13	10	72	2491	2157	6859	9214
14	10	96	2418	2195	8618	9187
15	10	120	2274	1915	6539	7025
16	10	24	1353	1131	276	2859
17	10	48	2847	1803	3382	7104
18	10	72	2394	2157	5191	9214
19	10	96	2382	2195	6308	9187
20	10	120	3111	1915	7219	7025
21	15	24	1329	1330	3702	2859
22	15	48	2290	2002	4126	7104
23	15	72	2883	2357	5281	9214
24	15	96	3203	2394	3176	9187
25	15	120	2887	2115	2098	7025
26	20	24	533	1220	4421	2859
27	20	48	913	1892	11287	7104
28	20	72	1293	2247	14444	9214
29	20	96	1013	2284	7719	9187
30	20	120	1061	2005	5833	7025
31	30	24	440	73	3497	2859
32	30	48	1077	744	8284	7104
33	30	72	1153	1099	13109	9214
34	30	96	1057	1137	7129	9187
35	30	120	1393	857	6308	7025



Os *P-values* indicaram a significância de cada um dos coeficientes da regressão. Os valores menores que 0,05 são considerados significativos. No caso do modelo para a variável resposta produção de PL, os parâmetros estimados e os *P-values* correspondentes mostram que as variáveis independentes concentração de sacarose ( $X_1$ ) e tempo ( $X_2$ ) tiveram um efeito significativo sobre a produção de PL. Por outro lado, no modelo para a produção de PG, os parâmetros estimados e os *P-values* correspondentes mostram que entre as variáveis independentes, somente o tempo mostrou efeito significativo sobre a produção de PG. Em ambos os modelos, os coeficientes dos termos lineares foram todos positivos, o que significa que aumentando os níveis de todos os fatores deve-se obter uma maior produção das enzimas. Por outro lado, como os coeficientes dos termos quadráticos são todos negativos, a elevação dos níveis dos fatores também tenderá a diminuir a produção enzimática. Isso sugere que a região ótima de produção das enzimas foi alcançada pelo modelo.

A não significância dos componentes  $\beta_{ij}x_i x_j$  nas duas equações ajustadas mostrou que as interações entre as variáveis independentes não contribuíram para a resposta em um nível significativo. Isso significa que a equação não evidencia um efeito sinérgico ou antagônico resultante da interação do tempo e da concentração na produção enzimática, ou seja, o efeito de uma variável independe da outra variável.

Os valores da produção de PL e PG estimados pelos modelos podem ser visualizados na Tabela 4.

A análise de variância, apresentada na Tabela 5, tem por objetivo verificar a adequação dos modelos ajustados aos dados experimentais. Um dos parâmetros utilizados é o coeficiente de variação (CV), que indica o grau de precisão com os quais os tratamentos foram comparados, e é calculado pela razão entre o desvio padrão em torno da média e a média dos dados. Normalmente, quanto maior o valor de CV, menor a reprodutibilidade do experimento. O experimento apresentou um CV de 41,14% para a produção de PL e de 52,47% para a produção de PG, sugerindo uma considerável variação em torno da média. Outro parâmetro que avalia a qualidade do modelo ajustado é a significância da falta de ajustamento do modelo. Os modelos para produção de PL e de PG apresentaram uma falta de ajustamento não significativa (*P-value* de 0,104 e 0,851, respectivamente), indicando que

**Tabela 5.** Análises de variância para as respostas produção de PL<sup>a</sup> e PG<sup>b</sup> pela linhagem recombinante *P. griseoroseum* cultivada a 150 rpm e 25°C, em frascos Erlenmeyer contendo meio mínimo tamponado adicionado de açúcar cristal como fonte de carbono.

Resposta	Termos do Modelo	Graus de liberdade	Estimado	Erro padrão	Soma de quadrados	Quadrados médios	F-value	P-value
Y <sub>1</sub>	β <sub>0</sub>	–	-1185,4	770	–	–	–	0,134
	X <sub>1</sub>	1	194,58	729,3	1500918	–	–	0,012 <sup>c</sup>
	X <sub>2</sub>	1	47,82	17,55	2693120	–	–	0,011 <sup>c</sup>
	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	-6,187	199,6	4464655	–	–	0,004 <sup>c</sup>
	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	-0,2753	0,1196	2464137	–	–	0,028 <sup>c</sup>
	Modelo completo	4	–	–	11122830	2780707	5,98	0,001 <sup>c</sup>
	Erro total	30	–	–	13946294	464876	–	–
	Erro puro	10	–	–	2610534	261053	–	–
	Falta de ajustamento	20	–	–	11335760	566788	2,17	0,104
	Total	34	–	–	25069124	–	–	–
Y <sub>2</sub>	β <sub>0</sub>	–	-3522	3011	–	–	–	0,251
	X <sub>2</sub>	1	310,37	95,60	75929933	–	–	0,003 <sup>c</sup>
	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	-1,8540	0,6513	111758298	–	–	0,008 <sup>c</sup>
	Modelo completo	2	–	–	187688231	93844115	6,80	0,003 <sup>c</sup>
	Erro total	32	–	–	441387159	13793349	–	–
	Erro puro	30	–	–	436666072	14555536	–	–
	Falta de ajustamento	2	–	–	4721087	2360544	0,16	0,851
	Total	34	–	–	629075390	–	–	–

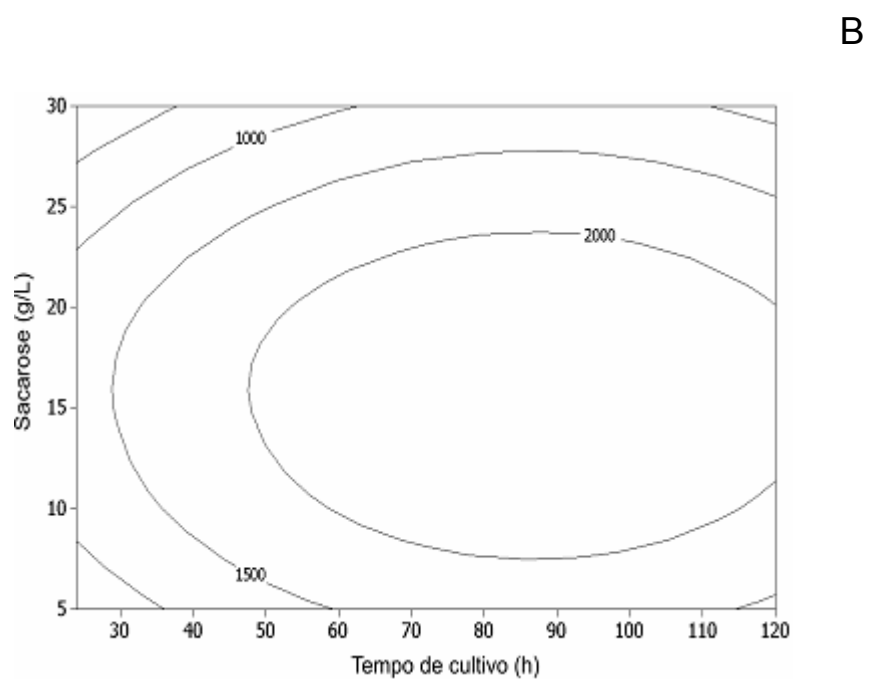
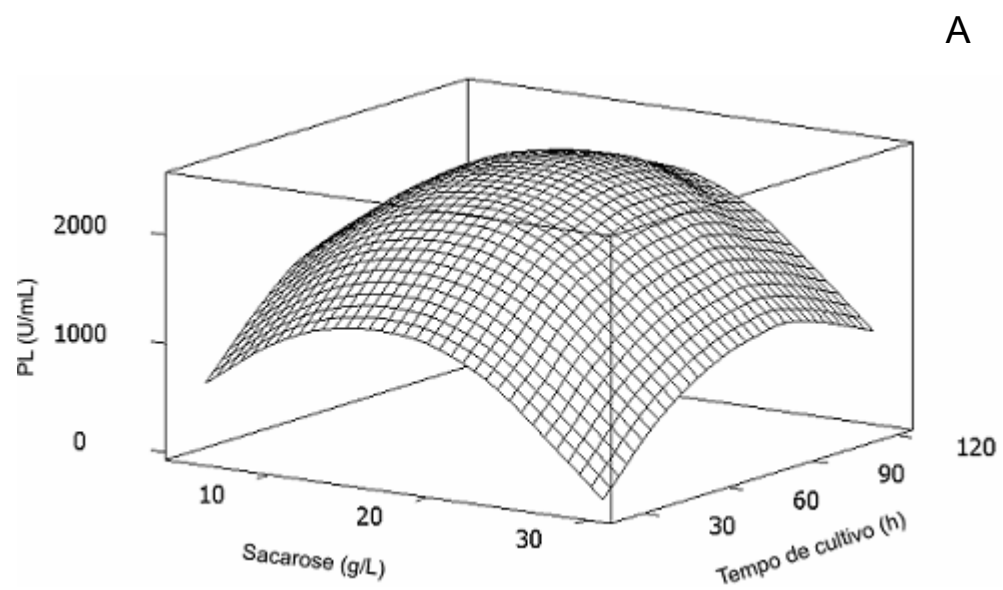
Coeficiente de variação (CV): <sup>a</sup>41,14, <sup>b</sup> 52,47. Coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>): <sup>a</sup>0,4437, <sup>b</sup> 0,2984. <sup>c</sup> Significativo ao nível de 5% (P<0,05).

os modelos são adequados para estimarem as variáveis resposta. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) fornece um indicativo da precisão do modelo. Ele representa a percentagem de variação explicada pela regressão, e é calculado pela razão da soma de quadrados da regressão pela soma de quadrados total. Os valores de  $R^2$  foram de 0,4437, para a produção de PL, e 0,2984 para a produção de PG, o que significa que os modelos ajustados explicam 44,37 e 29,84% da variação observada, respectivamente. Entretanto, esses valores de  $R^2$  não podem ser comparados com 100% por causa da contribuição do erro puro. Como nenhum modelo pode reproduzir a soma quadrática do erro puro, o valor máximo explicável é a diferença entre a soma quadrática total e à soma quadrática devida ao erro puro. A porcentagem máxima de variação explicável foi de 89,59% no caso do modelo ajustado para produção de PL e de 30,59% no caso do modelo ajustado para PG. É com esses valores que se deve comparar a variação explicada pela regressão. Eles indicaram uma contribuição relativamente grande do erro puro no resíduo. Os resultados sugerem que os modelos ajustados foram adequados para explicar somente parte da variação observada.

As superfícies de resposta descritas pelos modelos de regressão são apresentadas nas Figuras 3 e 4. Os gráficos de superfície fornecem uma visualização tridimensional da tendência estimada para a variação da produção de PL e PG pela linhagem recombinante *P. griseoroseum* T20, em função do tempo de cultivo e de diferentes concentrações de sacarose. Os gráficos de contorno representam a produção enzimática por meio de linhas nas quais os valores estimados são iguais, delimitando regiões chamadas de contorno.

A Figura 3A evidencia que o modelo abrangeu a região ótima para a produção de PL, localizada no pico da superfície. A produção de PL decresceu nos valores extremos de concentração de sacarose e tempo de cultivo. A Figura 3B facilita a identificação do ponto de produção máxima, situado em um platô delimitado por 47,6 e 127,8 horas de cultivo e 7,5 e 23,8 g/L de sacarose. A máxima produção estimada de PL ocorreu em 87,7 horas de cultivo e 15,7 g/L de sacarose. Nessa condição, a atividade estimada de PL foi de 2.428 U/mL.

A Figura 4A evidencia que o modelo abrangeu a região ótima do tempo de cultivo para produção de PG, que decresceu nos valores extremos de tempo



**Figura 3.** Superfície de resposta dos efeitos combinados da concentração de sacarose e do tempo de cultivo na produção de PL. O pico do gráfico de superfície (A) representa a máxima atividade estimada de PL. As linhas do gráfico de contorno (B) representam a atividade de PL (U/mL). A agitação e a temperatura foram mantidas constantes nos valores de 150 rpm e 25 °C, respectivamente.

de cultivo. A concentração de sacarose não mostrou influência significativa na produção de PG. O ponto de produção máxima situou-se na região entre 63,0 e 101,2 horas, como pode ser visualizado na Figura 4B. A máxima produção estimada de PG ocorreu em 83,8 horas. Nessa condição, a atividade estimada de PG foi de 9.465 U/mL.

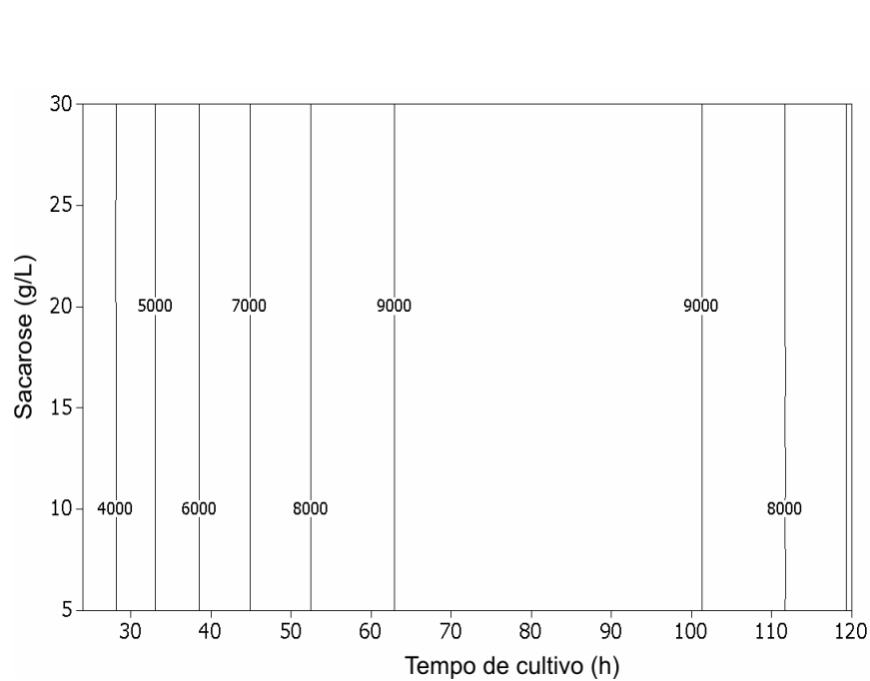
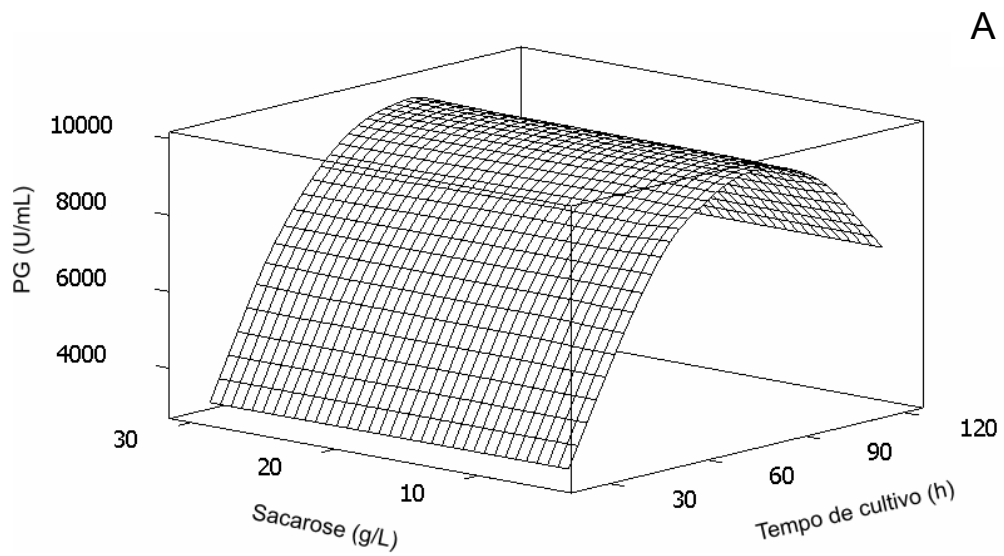
Os modelos ajustados apresentaram significância estatística, mostrando-se úteis para estimar a produção de PL e PG e indicar a melhor condição para produção das enzimas. Entretanto, eles foram capazes de explicar somente parte da variação observada. Os baixos valores de  $R^2$  e os consideráveis valores de CV sugerem a grande contribuição de fatores não controlados que influenciaram a experimentação ou o processo de produção das enzimas.

Com o objetivo de estimar com precisão a produção enzimática em função do tempo de cultivo, foram propostos ajustes polinomiais dos dados experimentais para a produção de PL e PG nas condições ótimas de cultivo determinadas pela RSM. A Equação 10 apresenta o ajuste para a produção de PL em função do tempo em sacarose a 15 g/L, condição experimental que mais se aproximou da condição ótima determinada pela RSM. A Equação 11 apresenta o ajuste para a produção de PG em função do tempo na mesma condição escolhida no ajuste da Equação 10, sacarose a 15 g/L, uma vez que esse fator não mostrou influencia significativa na variável resposta, segundo a RSM.

$$Y_1 = 271,4 + 45,31X_2 - 0,0016X_2^2 - 0,001616X_2^3 \quad (10)$$

$$Y_2 = 1378 + 118,8X_2 - 1,162X_2^2 + 0,00178X_2^3 \quad (11)$$

A regressão para a produção de PL mostrou um  $R^2$  de 0,999 e um CV de 2,17%, indicando alta precisão na predição de valores futuros da produção de PL em resposta ao tempo de cultivo em sacarose a 15 g/L. A regressão para a produção de PG também mostrou precisão em estimar a produção dessa enzima, com um  $R^2$  de 0,823 e um CV de 26,9%. A Tabela 6 apresenta os valores estimados pelas Equações 10 e 11, que serão úteis para verificar a manutenção dos níveis de atividade enzimática ao longo do tempo durante o processo de escalonamento da produção das enzimas para biorreatores industriais, comparando os valores experimentais com os estimados.



**Figura 4.** Superfície de resposta e gráfico de contorno dos efeitos combinados da concentração de sacarose e do tempo de cultivo na produção de PG. O pico do gráfico de superfície (A) representa a máxima atividade estimada de PG. As linhas do gráfico de contorno (B) representam a atividade de PG (U/mL). A agitação e a temperatura foram mantidas constantes nos valores de 150 rpm e 25 °C, respectivamente.

**Tabela 6.** Produção experimental e estimada de PL e PG pela linhagem recombinante *P. griseoroseum* cultivada a 150 rpm e 25°C, em frascos Erlenmeyer contendo meio mínimo tamponado adicionado de açúcar cristal a 15 g/L.  $X_2$  corresponde aos valores de tempo de cultivo.

Níveis $X_2$ (h)	Produção de PL (U/mL)		Produção de PG (U/mL)	
	Experimental	Estimada	Experimental	Estimada
24	1329	1309	3702	3584
48	2290	2317	4126	4599
72	2883	2922	5281	4571
96	3203	3123	3176	3649
120	2887	2920	2098	1980

Com o objetivo de comparar a produção otimizada de PL e PG pela linhagem recombinante *P. griseoroseum* T20 com aquela efetuada pelas linhagens previamente obtidas em nosso laboratório, foram conduzidas fermentações controle, apresentadas na Tabela 7. Os valores de produção de PL, de PG e de biomassa apresentados foram observados após 72 horas de cultivo. Os resultados mostram aumentos de mais 400 vezes na produção de PL e de pelo menos 14 vezes na produção de PG em relação as linhagem selvagem e mutante PG63, cultivadas em açúcar cristal e extrato de levedura. As linhagens recombinantes T105 e T146 apresentaram, como esperado, produção de PL e PG semelhantes à T20, respectivamente. Os dados demonstram o potencial das linhagens *P. griseoroseum* T105, T146 e T20 para a aplicação industrial.

**Tabela 7.** Produção de PL, PG e massa micelial seca pelas linhagens de *P. griseoroseum* selvagem e mutante PG63, cultivadas em sacarose 15 g/L e extrato de levedura 0,6 g/L e recombinantes T146, T105 e T20, cultivadas em sacarose 15 g/L. Os valores representam a produção enzimática observada pós 72 horas de cultivo, e a biomassa correspondente.

	Atividade de PL (U/mL)	Atividade de PG (U/mL)	Massa micelial seca (g/L)
W	6,8	379	7,9
PG63	5,5	276	7,5
T105	2072	235	2,8
T146	5,5	4290	2,1
T20	2883	5281	2,5

W: Linhagem selvagem de *P. griseoroseum*



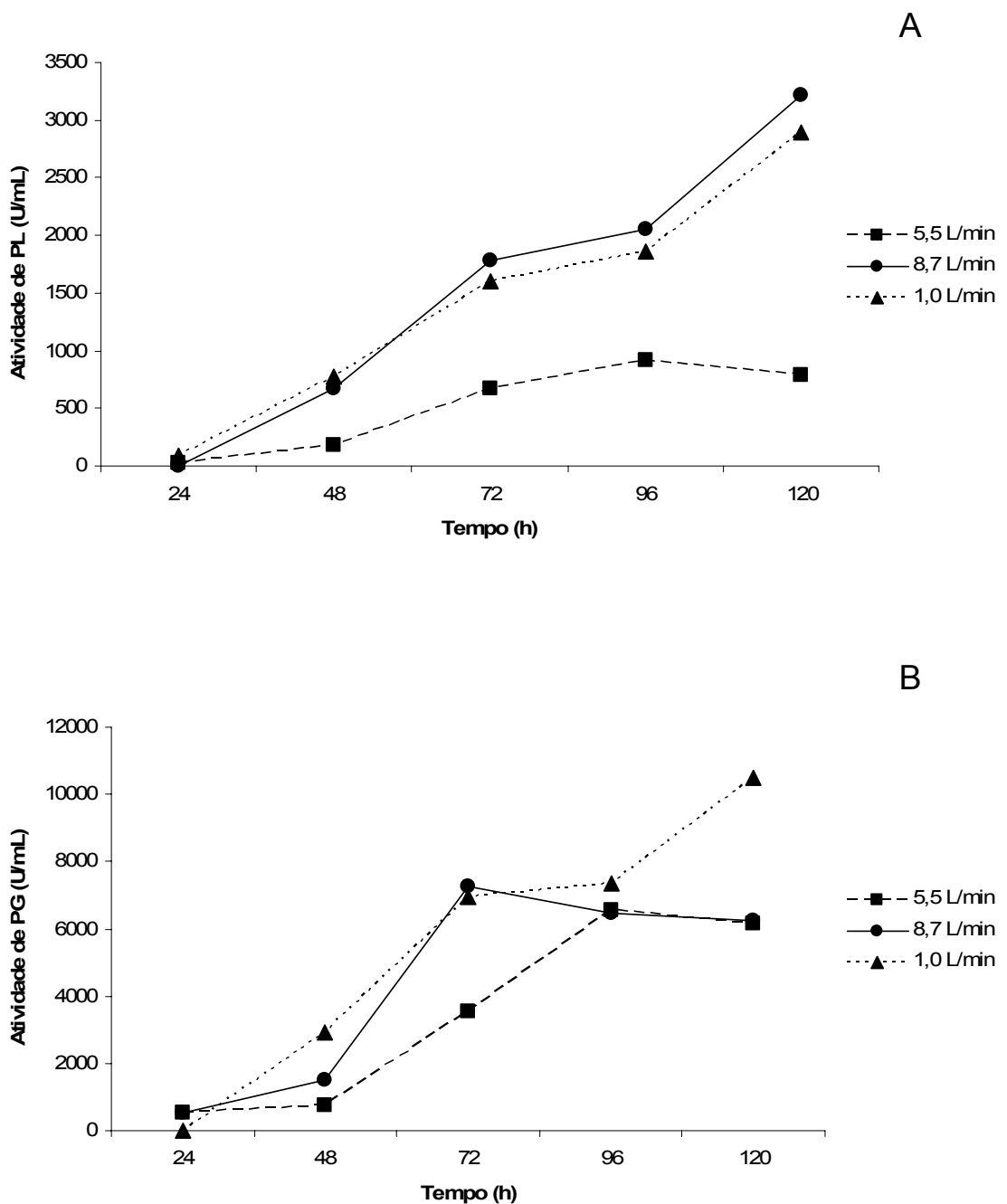
#### 4.2. Produção de pectina liase e poligalacturonase em biorreator

Fermentações em batelada foram conduzidas em biorreator BioFlo IV<sup>®</sup>, com volume de trabalho de 10L, após determinação das condições ótimas para a produção de PL e PG pela linhagem *P. griseoroseum* T20 cultivada em Erlenmeyers de com 200 mL de meio. Considerando que o ponto ótimo de concentração de sacarose para a produção de PL situou-se em um platô entre 7,5 e 23,8 g/L de sacarose, e que a influência deste fator sobre a produção de PG não foi considerada significativa, foi selecionada a concentração de 10 g/L para a produção simultânea das duas enzimas em biorreator. Essa escolha objetivou o menor custo de substrato. Três condições de aeração foram testadas: 1,0, 5,5 e 8,7 litros de ar por minuto.

A Figura 5 mostra a atividade de PL e PG em diferentes condições de aeração, em função do tempo de cultivo. As maiores atividades de PL foram observadas nas condições de aeração de 1,0 e 8,7 L/min, chegando a 2.895 e 3.211 U/mL, respectivamente. A maior atividade de PG, de 10.491 U/mL, foi observada na condição de aeração de 1,0 L/min. Após 120 horas de cultivo nas condições de aerações de 5,5 e 8,7 L/min, não houve diferença significativa na atividade de PG, segundo teste Tukey, à significância de 5%. O mesmo foi observado para a atividade de PL nas condições de 1,0 e 8,7 L/min.

Os resultados da fermentação em biorreator indicaram que, para uma produção simultânea de PL e PG, é conveniente que se utilize a aeração de 1,0 L/min. Nessa condição, a atividade máxima de PL e PG, 2.999 e 10.491 U/mL, respectivamente, se deu a 120 horas. Os perfis de atividade das enzimas visualizados nas Figura 5A e 5B sugerem que tempos de cultivo maiores podem resultar em maior produção.

A fermentação que proporcionou a maior produção de PL e PG foi escolhida para avaliações no filtrado da cultura. Determinou-se a atividade de  $\beta$ -glicosidades e proteases, a proteína total e o perfil de proteínas extracelulares, ao longo do tempo de 120 horas de cultivo, na condição de aeração de 1,0 L/min.



**Figura 5.** Efeito da aeração na produção de PL e PG pela linhagem *P. griseoroseum* T20 cultivada em biorreator. A atividade de PL (A) e PG (B) em 10L de meio de cultivo é mostrada nas condições de aeração de 1,0, 5,5 e 8,7 L/min, em meio contendo açúcar cristal 10 g/L como fonte de carbono. As condições de agitação e temperatura, 250 rpm e 25 °C, respectivamente, foram mantidas constantes.

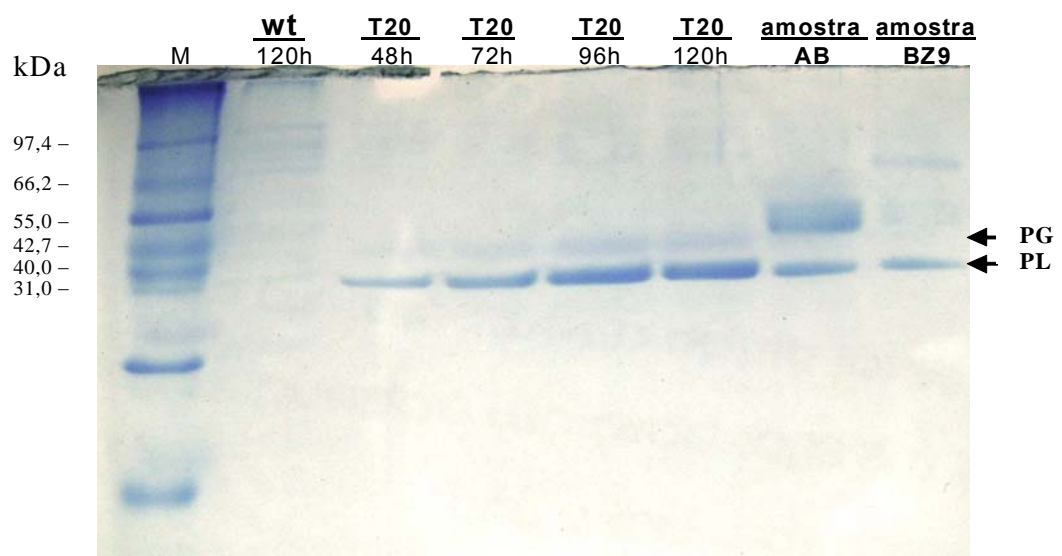
As atividades de protease e  $\beta$ -glicosidade e a quantidade de proteína total da linhagem *P. griseoroseum* T20 cultivada em biorreator estão apresentadas na Tabela 8. Não foi detectada a atividade de  $\beta$ -glicosidase no filtrado da cultura em nenhum tempo da fermentação. A atividade proteolítica foi detectada, em baixos valores, somente após 96 horas de cultivo da linhagem *P. griseoroseum* T20.

O perfil de proteínas extracelulares foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida e é mostrado na Figura 6. Os filtrados enzimáticos provenientes da fermentação foram dialisados, concentrados e posteriormente submetidos à eletroforese. Preparações comerciais (AB, Biozyme<sup>®</sup>; BZ9, Bioenzima<sup>®</sup>) foram diluídas e também submetidas à eletroforese. O perfil protéico da linhagem recombinante T20 apresentou duas bandas evidentes e distintas, de aproximadamente 38 e 36 kDa. A banda maior foi associada à PG e a menor, à PL. A produção de PL e PG pela linhagem recombinante T20, evidenciada pelo perfil protéico confirma que, uma vez que tenha ocorrido a síntese destas proteínas, elas se mantêm no sobrenadante por pelo menos 120 horas de cultivo. No perfil protéico da linhagem selvagem, as bandas correspondentes a PL e PG não foram visualizadas na mesma intensidade, já que, nessa linhagem, a produção de pectinases só ocorre em presença do indutor.

**Tabela 8.** Atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidade, protease e proteína total do filtrado da cultura da linhagem *P. griseoroseum* T20 cultivada em açúcar cristal 10 g/L, 1,0 L/min, 250 rpm e 25 °C, em biorreator.

Tempo de cultivo (h)	Atividade de $\beta$ -glicosidade (U/mL)	Atividade de protease ( $\mu$ g/mL)	Proteína total (mg/L)
24	Nd	0,0	1,3
48	Nd	0,0	4,9
72	Nd	0,0	8,7
96	Nd	0,9	9,0
120	Nd	1,6	9,5

Nd.: Não detectada.



**Figura 6.** Perfil de proteínas extracelulares das linhagens *P. griseoroseum* selvagem (*wt*) e recombinante (*T20*) e das amostras AB e BZ9, utilizando-se SDS-PAGE. Os filtrados das culturas das linhagens de *P. griseoroseum* foram concentrados e as amostras AB e BZ9 diluídas, para se aplicar no gel desnaturante de poliácridamida 12,5% 10 µg de proteína total. Utilizou-se 5 µg do marcador médio de massa molecular de proteínas da Promega (14,4-97,4 kDa). As setas indicam a posição das proteínas poligalacturonase (PG), de ~38 kDa e pectina liase (PL), de ~36 kDa.

### 4.3. Avaliação do crescimento e morfologia miceliais da linhagem *Penicillium griseoroseum* T20 durante a fermentação

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) foi utilizada para se estudar o crescimento micelial ao longo da fermentação, em diferentes concentrações de sacarose.

A Tabela 9 representa a matriz do planejamento experimental com a variável resposta obtida experimentalmente.

Os dados experimentais foram submetidos a análises estatísticas de regressão múltipla e permitiram ajustar uma equação polinomial de primeiro grau, mostrada na Equação 12:

$$Y_3 = 0,796 + 0,00218X_1X_2 \quad (12)$$

onde  $Y_3$  é a respostas estimadas produção de massa micelial seca e  $X_1$  e  $X_2$  são os valores de concentração de sacarose e de tempo de cultivo.

A significância estatística da Equação 12 foi verificada pelo teste  $F$  e a análise de variância para o modelo quadrático da superfície de resposta é mostrada na Tabela 10. Em um nível de 95% de confiança, o modelo para produção de massa micelial seca apresentou um  $F$ -value calculado maior que o tabelado (Box e Wilson, 1951). Pôde-se observar que ambos os modelos de regressão foram significativos.

Os  $P$ -values indicaram a significância de cada um dos coeficientes da regressão. Os valores menores que 0,05 são considerados significativos. As variáveis independentes concentração de sacarose ( $X_1$ ) e tempo ( $X_2$ ) não apresentaram efeito significativo sobre a produção de massa micelial seca, enquanto que o componente  $\beta_{ij}x_i x_j$  na equação ajustada mostrou que existe interação entre as variáveis independentes em um nível significativo. Isso significa que há um efeito sinérgico resultante da interação do tempo e da concentração na produção enzimática. O coeficiente positivo do termo linear  $\beta_{ij}x_i x_j$  da Equação 12 sugere que aumentando os níveis de todos os fatores deve-se obter uma maior produção de massa micelial.

Os valores da produção de biomassa estimados pelos modelos podem ser visualizados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Matriz do planejamento fatorial completo para a produção de massa micelial seca. As variáveis independentes estudadas foram concentração de sacarose ( $X_1$ ) e tempo de cultivo ( $X_2$ ).

Unidades experimentais	Níveis		Produção de massa micelial seca (g/L)	
	$X_1$ (g/L)	$X_2$ (h)	Experimental	Estimada
1	5,0	24	1,19	1,06
2	5,0	48	2,30	1,32
3	5,0	72	2,26	1,58
4	5,0	96	2,44	1,84
5	5,0	120	2,49	2,10
6	10	24	0,88	1,32
7	10	48	1,56	1,84
8	10	72	2,67	2,36
9	10	96	3,48	2,88
10	10	120	3,74	3,41
11	10	24	0,80	1,32
12	10	48	1,63	1,84
13	10	72	2,95	2,36
14	10	96	3,27	2,88
15	10	120	3,92	3,41
16	15	24	0,78	1,58
17	15	48	1,38	2,36
18	15	72	2,54	3,14
19	15	96	2,58	3,93
20	15	120	3,84	4,71
21	20	24	1,47	1,84
22	20	48	2,88	2,88
23	20	72	4,14	3,93
24	20	96	5,40	4,97
25	20	120	6,74	6,02
26	30	24	1,61	2,36
27	30	48	3,94	3,93
28	30	72	6,48	5,49
29	30	96	6,80	7,06
30	30	120	8,19	8,63

**Tabela 10.** Análises de variância para a resposta produção massa micelial pela linhagem recombinante *P. griseoroseum* cultivada a 150 rpm e 25°C, em frascos Erlenmeyer contendo meio mínimo tamponado adicionado de açúcar cristal como fonte de carbono.

Resposta	Termos do Modelo	Graus de liberdade	Estimado	Erro padrão	Soma de quadrados	Quadrados médios	F-value	P-value
Y <sub>3</sub>	$\beta_0$	–	0,796	0,189	–	–	–	0,000 <sup>c</sup>
	$X_1X_2$	1	0,00218	0,00139	–	–	–	0,000 <sup>c</sup>
	Modelo completo	1	–	–	96,752	96,752	244,21	0,000 <sup>c</sup>
	Erro total	28	–	–	11,093	0,396	–	–
	Erro puro	14	–	–	6,555	0,486	–	–
	Falta de ajustamento	14	–	–	4,538	0,324	0,69	0,750
	Total	29	–	–	107,845	–	–	–

Coeficiente de variação (CV): 19,19. Coeficiente de determinação ( $R^2$ ): 0,8971.

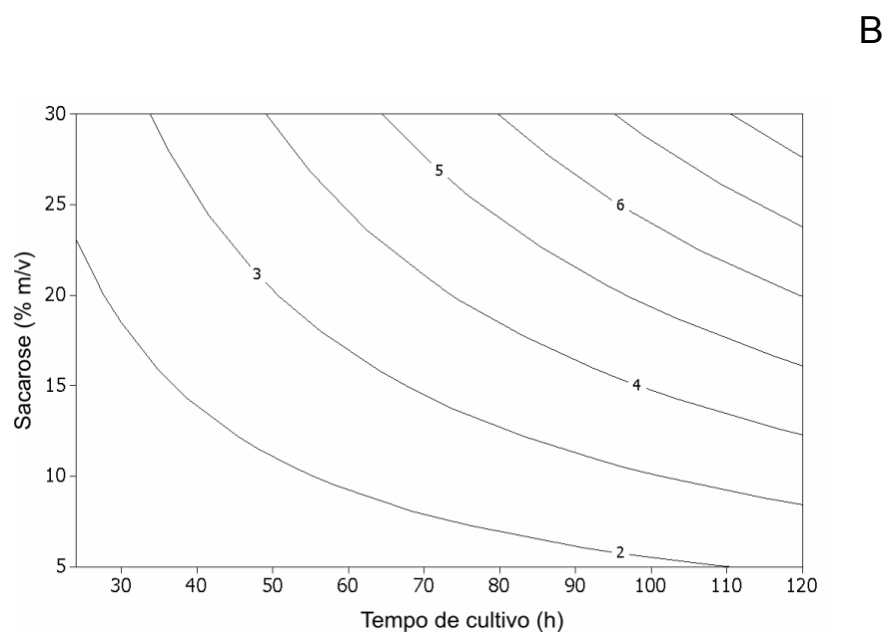
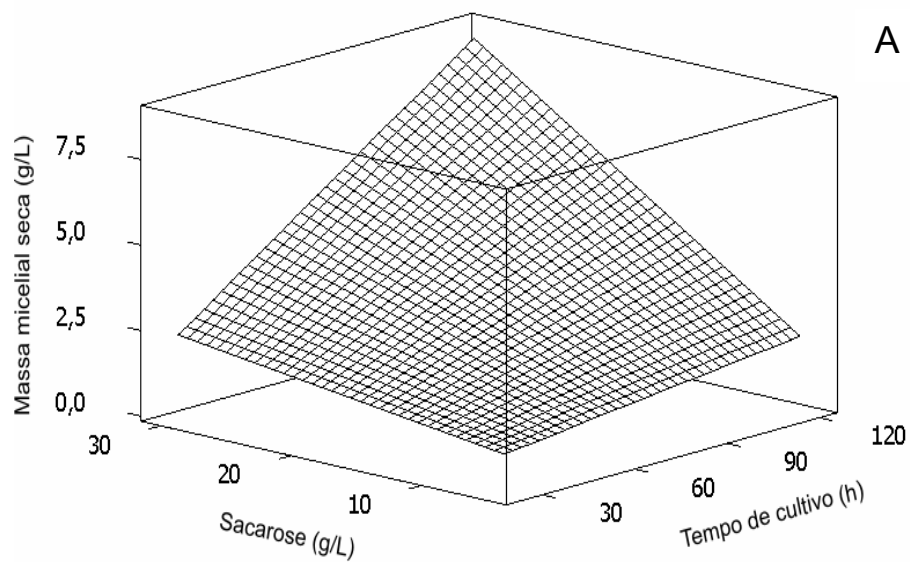
<sup>c</sup> Significativo ao nível de 5% ( $P < 0,05$ ).



O coeficiente de variação (CV) de 19,2% observado na regressão e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,897 indicaram a confiabilidade e precisão do modelo. O coeficiente de determinação evidenciou que o modelo ajustado foi adequado para explicar 89,7% da variação observada, sendo essa variação atribuída às variáveis independentes, e somente 10,3% da variação total não pôde ser explicada pelo modelo. A porcentagem máxima de variação explicável foi de 95,8%, mostrando pequena contribuição do erro puro no resíduo. É com esse valor que se deve comparar a variação explicada pela regressão. A falta de ajustamento do modelo apresentou-se não significativa (*P-value* de 0,750), indicando que o modelo é adequado para estimar a variável resposta.

A Figura 7 mostra a superfície de resposta descrita pelo modelo de regressão. Pode se observar no gráfico de superfície (Figura 7A) que, em pequenas concentrações de sacarose e nas horas iniciais do cultivo, a produção de biomassa aumenta a uma taxa menor. Entretanto, quando a concentração de sacarose e o tempo de cultivo se aproximam de 30 g/L e 120 horas, respectivamente, ocorre um sinergismo na produção de biomassa. A máxima massa micelial seca estimada foi de 8,63 g/L em sacarose a 30 g/L e após 120 horas de cultivo. O gráfico de contorno apresentando na Figura 7B identifica a região de maior produção de biomassa.

A RSM demonstrou-se uma ferramenta útil para o estudo do crescimento micelial ao longo da fermentação, fornecendo um modelo matemático capaz de estimar a produção micelial com elevada precisão.



**Figura 7.** Superfície de resposta dos efeitos combinados da concentração de sacarose e do tempo de cultivo na produção de biomassa. O pico do gráfico de superfície (A) representa a máxima produção estimada de biomassa. As linhas do gráfico de contorno (B) representam a massa micelial seca (g/L). A agitação e a temperatura foram mantidas constantes nos valores de 150 rpm e 25 °C, respectivamente.

Com o objetivo de avaliar a morfologia micelial da linhagem *P.griseoroseum* T20, amostras foram colhidas durante a fermentação em biorreator, na condição de baixa aeração 1,0 L/min e analisadas macroscopicamente.

A Figura 8 apresenta a fotomicrografia do micélio em forma de esfera, após 120 horas de cultivo em biorreator. A morfologia de fungos filamentosos cultivados em fermentação submersa pode variar entre duas formas: esferas e filamentos livres. A morfologia da esfera foi caracterizada por um núcleo micelial compacto e pela presença de hifas dispersas com crescimento micelial externo ao redor desse núcleo. A estrutura mostrou-se predominante entre as formas miceliais encontradas na cultura, embora também tenham sido observadas formas de hifas livres, mesmo após o longo tempo de fermentação.



**Figura 8.** Fotomicrografia do micélio da linhagem *P. griseoroseum* T20 cultivada durante 120 horas em biorreator com volume de 10 L, na condição de 10 g/L de sacarose e 1,0 L de ar por minuto.

#### 4.4. Cinética do processo fermentativo

O estudo cinético do processo de produção de PL e PG pela linhagem *P. griseoroseum* T20 cultivada em 200 mL e em 10 L de meio foi realizado nas condições ótimas de cultivo. Os parâmetros da fermentação foram calculados na condição de sacarose a 15 g/L, quando a linhagem *P. griseoroseum* T20 foi cultivada em 200 mL, e na condição de sacarose a 10 g/L, quando o cultivo ocorreu em 10 L.

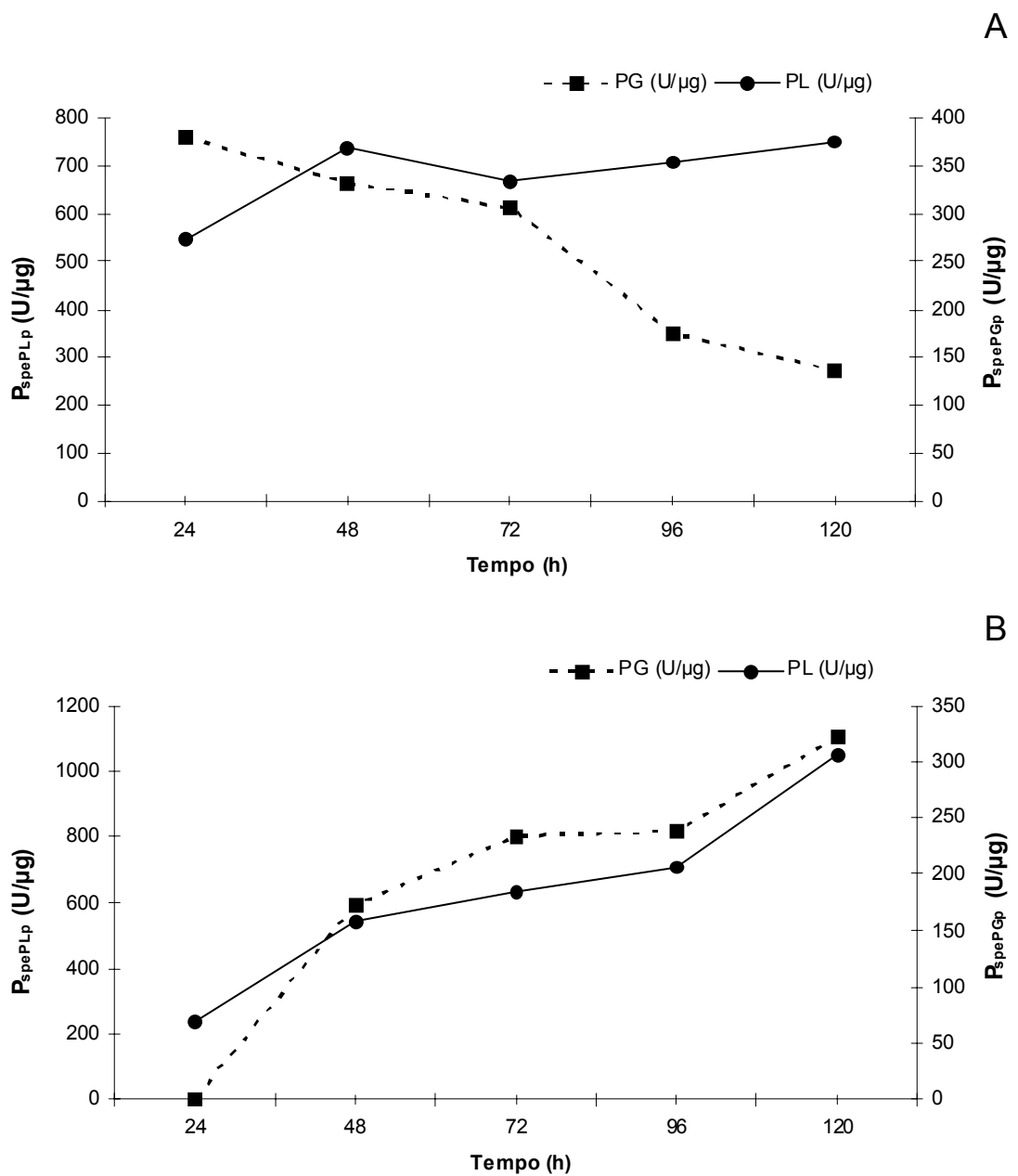
A Figura 9 apresenta a variação das atividades específicas de PL ( $P_{\text{spePLp}}$ ) e PG ( $P_{\text{spePGp}}$ ) em relação à proteína total, em função do tempo de cultivo em Erlenmeyer e em biorreator. As máximas  $P_{\text{spePLp}}$  e  $P_{\text{spePGp}}$  em Erlenmeyers foram de 353 e 613 U/ $\mu\text{g}$ , enquanto que em fermentador 305 e 1.106 U/ $\mu\text{g}$ , respectivamente.

Os parâmetros cinéticos calculados para a fermentação em 200 mL de meio de cultivo podem ser visualizados na Tabela 11. A proteína total máxima observada foi de 9,1 mg/L. A maior produção de PL ( $P_{\text{PLmax}}$ ) e PG ( $P_{\text{PGmax}}$ ), 3.203 e 5.281 U/mL ocorreu às 96 e 72 horas de cultivo, respectivamente. Nesse tempo de cultivo, as atividades específicas de PL ( $P_{\text{spePLm}}$ ) e PG ( $P_{\text{spePGm}}$ ) em relação à biomassa foram de 1.242 e 2.077 U/mg, enquanto que as atividades específicas de PL ( $P_{\text{spePLp}}$ ) e PG ( $P_{\text{spePGp}}$ ) em relação à proteína total foram de 353 e 613 U/ $\mu\text{g}$ , respectivamente. A produtividade em biomassa ( $Pd_x$ ), que fornece uma importante informação sobre a produção de massa micelial média por unidade de tempo, foi de 32,0 mg/L.h. As produtividades enzimáticas de PL ( $Pd_{\text{PL}}$ ) e PG ( $Pd_{\text{PG}}$ ) foram de 33,4 e 73,3 U/mL.h. Esses parâmetros estimam a produção enzimática média por unidade de tempo. Os parâmetros rendimento de biomassa ( $R_{X/S}$ ), PL ( $R_{\text{PL/S}}$ ) e PG ( $R_{\text{PG/S}}$ ) calculados foram de 0,26, 214 e 352, respectivamente. Esses parâmetros, também conhecidos como fatores de conversão, permitem estimar o quanto de massa micelial seca, PL e PG, respectivamente, são produzidas em média por unidade de fonte de carbono fornecida.

A Tabela 12 apresenta os parâmetros calculados para a fermentação em 10 L de meio de cultivo. A proteína total máxima observada foi de 9,5 mg/L. A maior produção de PL ( $P_{\text{PLmax}}$ ) e PG ( $P_{\text{PGmax}}$ ), de 2.895 e 10.491 U/mL ocorreu às 120 horas de cultivo, respectivamente, um tempo que é superior ao observado no cultivo em 200 mL. As atividades específicas de PL ( $P_{\text{spePLp}}$ ) e

PG ( $P_{\text{spePGp}}$ ) em relação à proteína total, em 120 horas, foram de 305 e 1.106 U/ $\mu\text{g}$ , respectivamente. As produtividades enzimáticas de PL ( $Pd_{\text{PL}}$ ) e PG ( $Pd_{\text{PG}}$ ) foram de 24,1 e 289 U/mL.h. Os parâmetros relacionados à massa micelial seca não foram calculados, uma vez que não é possível sua medida no cultivo em biorreator. Os parâmetros rendimento de PL ( $R_{\text{PL/S}}$ ) e PG ( $R_{\text{PG/S}}$ ) calculados foram de 87,4 e 1.049, respectivamente.

Os resultados mostraram que houve uma tendência de manutenção dos parâmetros cinéticos da produção de PL durante o escalonamento de 200 mL para 10 L. Por outro lado, a maior produção de PG ( $P_{\text{PGmax}}$ ) e a atividade específica em relação à proteína ( $P_{\text{spePGp}}$ ) observados no cultivo em biorreator foi cerca de duas vezes maior do que em Erlenmeyer. Com relação a ambas as enzimas, o tempo de produção foi maior quando o cultivo ocorreu em biorreator.



**Figura 9.** Atividades específicas de PL ( $P_{spePLp}$ ) e PG ( $P_{spePGp}$ ) em relação à proteína total do filtrado da cultura em 200 mL (A) e 10 L (B). O cultivo da linhagem recombinante *P. griseoroseum* em 200 mL ocorreu em frascos Erlenmeyer contendo meio mínimo tamponado adicionado de sacarose a 15 g/L, a 150 rpm e 25°C. O cultivo em 10 L ocorreu em biorreator contendo meio mínimo tamponado adicionado de sacarose a 10 g/L, a 1,0 L de ar por minuto, 250 rpm e 25°C.

**Tabela 11.** Sumário dos parâmetros cinéticos obtidos para o cultivo da linhagem recombinante *P. griseoroseum* T20 em frascos Erlenmeyer contendo 200 mL de meio mínimo tamponado adicionado de açúcar cristal como fonte de carbono, a 150 rpm e 25°C.

$Q_{t\max}$ (mg/L)	$X_{\max}$ (g/L)	$P_{PL\max}$ (U/mL)	$P_{PG\max}$ (U/mL)	$P_{spePLm}$ (U/mg)	$P_{spePGm}$ (U/mg)	$P_{spePLp}$ (U/ $\mu$ g)	$P_{spePGp}$ (U/ $\mu$ g)
9,1	3,8	3.203	5.281	1.242	2.077	353	613
$t_{fPL}$ (h)	$t_{fPG}$ (h)	$Pd_x$ (mg/L.h)	$Pd_{PL}$ (U/mL.h)	$Pd_{PG}$ (U/mL.h)	$R_{X/S}$	$R_{PL/S}$ (U/mg)	$R_{PG/S}$ (U/mg)
96	72	32,0	33,4	73,3	0,26	214	352

**Tabela 12.** Sumário dos parâmetros cinéticos obtidos para o cultivo da linhagem recombinante *P. griseoroseum* T20 em biorreator contendo 10 L de meio mínimo tamponado adicionado de açúcar cristal como fonte de carbono, a 150 rpm e 25°C.

$Q_{t\max}$ (mg/L)	$P_{PL\max}$ (U/mL)	$P_{PG\max}$ (U/mL)	$P_{spePLp}$ (U/ $\mu$ g)	$P_{spePGp}$ (U/ $\mu$ g)	$t_{fPL}$ (h)	$t_{fPG}$ (h)	$Pd_{PL}$ (U/mL.h)	$Pd_{PG}$ (U/mL.h)	$R_{PL/S}$ (U/mg)	$R_{PG/S}$ (U/mg)
9,5	2.895	10.491	305	1.106	120	120	24,1	289	87,4	1.049

## 5. DISCUSSÃO

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) foi utilizada para a otimização da produção de pectina liase e poligalacturonase pela linhagem *P. griseoroseum* T20. Os modelos de regressão mostraram-se significativos e indicaram as condições ótimas de cultivo para produção de PL e PG entre os cinco níveis de concentrações de sacarose e de tempo de cultivo avaliados. Entretanto, nem sempre uma regressão dada como significativa é útil para realizar previsões. Pode acontecer que a faixa de variação coberta pelos fatores estudados seja pequena demais, fazendo com que o efeito sobre a resposta fique mascarado pela extensão do erro experimental (Neto et al., 2003). Esse erro foi consideravelmente alto especialmente na regressão ajustada para produção de PG, sendo evidenciado pelo valor de porcentagem máxima de variação explicável, que foi 30,5%. De fato, a reprodução de um processo biológico, como a produção de enzimas por fungos filamentosos, envolve um grande número de etapas, cujo controle se torna complexo, especialmente no caso do cultivo de microrganismos de morfologia heterogênea. Em algumas dessas etapas o controle de variáveis é mais crítico, como na preparação do inóculo, em que numa mesma placa de Petri contendo a cultura há a presença de esporos de diferentes viabilidades de idades, mesmo que se padronize as condições de cultivo.

A RSM tem sido usada em uma grande variedade de processos químicos e biológicos. Trupkin et al. (2003) utilizaram a RSM para otimizar a produção de enzimas lignolíticas pelo fungo *Trametes trogii*, bem como sua ação na descoloração de corantes. Os valores de  $R^2$  de 0,552 e 0,727 sugeriram que os modelos foram capazes de explicar somente parte da variação observada dos resultados experimentais. Por outro lado, Kammoun et al. (2008) otimizaram a produção de  $\alpha$ -amilase por *Aspergillus oryzae* CBS 819.72, usando a RSM por meio de diferentes planejamentos experimentais, como o fatorial completo, o Box-Wilson e o composto central rotacionado. O modelo ajustado mostrou-se significativo e o  $R^2$  de 0,957 indicou que somente 4,43% da variação total da resposta não foi explicada pelo modelo. O baixo valor de CV, de 2,22%, indicou grande precisão e reprodutibilidade experimental. Hajji et al. (2008) descreveram a otimização da produção de uma



protease alcalina por *Aspergillus clavatus* ES1 por meio da RSM. Os resultados da análise de variância mostraram uma alta significância do modelo, com  $p < 0,05$ , acompanhada de uma alta precisão, com um valor de  $R^2$  de 0,98. Li, et al. (2007) descreveram a otimização da produção de xilanase por *Penicillium oxalicum* ZH-30 em frascos Erlenmeyers e em biorreator, com 75 e 15.000 mL de meio de cultivo, respectivamente. O modelo ajustado pela RSM apresentou  $R^2$  de 0,907 e CV de 18,21%, explicando 90,7% dos dados observados.

Contudo, para muitos processos, o uso da RSM pode não ser adequado. Um problema encontrado na metodologia é que ela, usualmente, é baseada no uso de equações de segundo grau, e muitos processos só podem ser definidos por equações de ordem superiores. Embora seja possível predizer um modelo utilizando-se equações de ordem superior, a maioria dos pacotes de programas de estatística disponível utiliza somente equações de segunda ordem. Isso pode resultar na subutilização da metodologia, uma vez que, nesses casos, os modelos ajustados não serão capazes de descrever com precisão e confiabilidade o processo de interesse (Baş e Boyacı, 2007). Portanto, o baixo valor de  $R^2$  encontrado na equação do modelo ajustado para a produção de PL sugere que a equação de segundo grau utilizada, embora tenha permitido delimitar os parâmetros ótimos, não foi totalmente adequada para explicar o processo em questão.

Após otimização por RSM em 200 mL, a linhagem *P. griseoroseum* T20 foi cultivada em 10 L na condição em que os modelos de regressão ajustados estimaram a maior faixa de produção de PL e PG. Os parâmetros cinéticos do processo fermentativo em 10 L foram calculados e comparados com aqueles obtidos na fermentação em 200 mL. Os resultados mostraram que os parâmetros calculados para produção de PL apresentaram valores semelhantes em ambas as escalas de cultivo. Por outro lado, os mesmos parâmetros para produção de PG mostraram um aumento considerável. Porém, o tempo de cultivo para a produção de PL e PG foi maior no cultivo em biorreator, o que resultou em uma menor produtividade de PL, uma vez que esse parâmetro é dependente do tempo. Resultados semelhantes em relação ao maior tempo de cultivo da fermentação em biorreator podem ser encontrados na literatura, sendo comumente atribuídos ao escalonamento, uma vez que novos fatores não controlados passam a atuar no sistema (Li, et al., 2007; Lotfy, et al., 2007).

A RSM foi também utilizada para descrever o crescimento micelial da linhagem *P. griseoroseum* T20 nas condições de cultivo para produção de PL e PG. Aqui o modelo mostrou alta significância e precisão. Adicionalmente, uma análise macroscópica foi realizada no micélio obtido do cultivo em biorreator na condição de baixa aeração, 1,0 L/min, em que se obteve a maior atividade de PL e PG. Nessa condição, após 120 horas, foi observada a presença de grande quantidade de micélio na forma de hifas livres (dados não mostrados), e também de esferas compactas com a presença de filamentos de hifas dispersos ao redor, com crescimento externo (Figura 10). Piccoli-Valle et al (2003) observaram as mesmas estruturas de hifas livres e hifas dispersas ao redor na esfera durante fermentação em biorreator Bioflo IV com volume de trabalho de 10 L, na condição inicial de ausência de aeração. Entretanto, após 48 horas de cultivo, em condição de aeração de 10 L/min, as esferas tiveram o diâmetro aumentado e não se observou mais hifas livres e dispersas.

A variedade morfológica é uma característica típica de fungos filamentosos. Muitos modelos matemáticos têm sido propostos na literatura para descrever o crescimento de fungos filamentosos, porém poucos trabalhos associam a morfologia à formação de produto (Aynsley et al., 1999; Bozhokin, 1996; Tavares et al., 2006). Ainda assim, acredita-se que a morfologia do fungo afeta o processo de secreção de proteínas durante a fermentação (Wang, 2005). A típica morfologia observada na condição de baixa aeração e a maior produção de PL e PG nessa condição sugerem que há uma relação entre a presença de hifas dispersas e livres e a maior secreção enzimática.

A linhagem *P. griseoroseum* T20 foi caracterizada sob diferentes aspectos da produção de PL e PG, e apresentou aumentos de mais 400 vezes na produção de PL e pelo menos de 14 vezes na produção de PG em relação as linhagem selvagem e mutante PG63, cultivadas em açúcar cristal e extrato de levedura. Os resultados sugerem o grande potencial de aplicação industrial dessa linhagem.

## 6. CONCLUSÕES

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) permitiu a produção de pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG) pela linhagem *P. griseoroseum* T20 sob condições otimizadas de concentração de sacarose e tempo de cultivo. A máxima produção estimada de PL ocorreu em 87,7 horas de cultivo e 15,7 g/L de sacarose. A máxima produção estimada de PG ocorreu em 83,8 horas.

O escalonamento da produção de 200 mL para 10 L de meio de cultivo foi realizado com a manutenção da produção e a produtividade de PL em níveis próximos aos observados em 200 mL, enquanto que para PG, houve um aumento considerável desses parâmetros.

Entre as condições de aeração estudadas, a que proporcionou a maior atividade de PL e PG foi de 1,0 L de ar por minuto. Nessa condição, a ausência de atividade de  $\beta$ -glicosidase e a baixa atividade de protease demonstraram o potencial da linhagem *P. griseoroseum* T20 para a aplicação industrial.

O perfil protéico demonstrou a presença de duas bandas de proteínas distintas com aproximadamente 38 e 36 kDa, correspondentes à PG e a PL, respectivamente, no filtrado enzimático da linhagem *P. griseoroseum* T20. As mesmas bandas não puderam ser visualizadas no filtrado da linhagem selvagem, evidenciando a maior produção das enzimas pela linhagem recombinante.

A RSM permitiu ajustar um modelo para a produção de biomassa pela linhagem *P. griseoroseum* T20. A máxima massa micelial seca estimada foi de 8,63 g/L, na condição de 30 g/L de sacarose e 120 horas de cultivo. A morfologia micelial foi avaliada durante a fermentação e sugeriu que existe uma relação entre a forma micelial de hifas livres e dispersas e a maior produção de PL e PG.

O estudo da cinética do processo de produção de PL e PG pela linhagem recombinante *P. griseoroseum* T20 foi realizado e será útil para a comparação dos parâmetros cinéticos calculados durante escalonamento até a produção industrial.

## 7. REFERÊNCIAS

- Abou-Zeid, A. M. Production, purification and characterization of an extracellular alpha-amylase enzyme isolated from *Aspergillus flavus*. *Microbios*, v.89, n.358, p.55-66. 1997.
- Albersheim, P. Pectin lyase from fungi. *Methods in Enzymology*, v.8, p.628-635. 1966.
- Albersheim, P., Killias, U. Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. *Achieves of Biochemistry and Biophysics*, v.97, n.1, p.107-115. 1962.
- Aynsley, M., Ward, A. C., Wright, A. R. A mathematical model for the growth of mycelial fungi in submerged culture. *Biotechnology and Bioengineering*, v.35, p.820-830. 1990.
- Baracat, M.C., Valentim, C., Muchovej, J.J., Silva, D.O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. *Biotechnology Letters*, v.11, n.12, p.899-902. 1989.
- Baş, D., Boyacı, I. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v.78, p.836–845. 2007.
- Bazzolli, D. S., Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. Molecular characterization and expression profile of pectin-lyase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.52, n.11, p.1070-7. 2006.
- Benen, J. A. E., Kester, H. C. M., Parenicová, L., Visser, J. Kinetics and mode of action of *Aspergillus niger* polygalacturonases. In: Visser, J., Voragen, A.G.J. (Eds.) *Pectins and pectinases*. Amsterdam: Elsevier, v. 14, 1996. Progress in Biotechnology. 990p.
- Bianchi, V. L. D., Moraes, I. O. M., Capalbo, D. M. F. Fermentação em estado sólido. In: Schmidell, W, Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W. (Ed.). *Biotecnologia industrial*. São Paulo, SP: Edgard Blücher, v.2, 2001, p.247.
- Bliyeva, R. K. Biosynthesis of enzymes by aggregated and immobilized mycelium of micromycetes. *Journal of Microbial Biotechnology*, v.3, p.37-44. 1988.

- Bon, E. P. S. et al. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro, Editora Interciência, UFRJ, CAPES, FAPERJ, FCT Portugal, 2008.
- Box, G. E. P., Wilson, K. B. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, v.13, n.1, p.1-45. 1951.
- Bozhokin, S. V. Mathematical model of the morphological structure of fungi. *Biophysics*, v.41, p.1327–1330, 1996.
- Bradford, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochemistry*, v.72, p.248-254. 1976.
- Calam, C.T. The evaluation of micelial growth. In: Norris, J.R., Ribbons, D.W. (Ed.). *Methods in Microbiology*. London: Academic Press, 1969. p. 567-591.
- Camassola, M., Dillon, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, v.103, p.2196–2204. 2007.
- Cardoso, P. G., Ribeiro, J. B., Teixeira, J. A., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. Overexpression of the *plg1* gene encoding pectin lyase in *Penicillium griseoroseum*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.35, n.3, p.159-166. 2008.
- Cardoso, P.G. Organização do gene de pectina liase em *Penicillium expansum* e obtenção de linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum* com alta produção de pectina liase (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004. 127p.
- Carr, J. G. Tea, coffee and cocoa. In: Wood BJB (ed) *Microbiology of fermented food*. London: Elsevier, v.2, 1985, p133–154.
- Castro, I. A., Tirapegui, J., Silva, R. S. S. F. Protein mixtures and their nutritional properties optimized by response surface methodology. *Nutrition Research*, v.20, n.9, p.1341-1353. 2000.
- Chavez, R., Bull, P., Eyzaguirre, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology*, v.123, n.4, p.413-33. 2006.

- Choudhari, S. M., Ananthanarayan L. Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues. *Food Chemistry*, v.102, n.1, p.77-81. 2007.
- Costa, R. B., Silva, M. V. A. *Enzimas Industriais: Avaliação do Mercado Nacional*. Fórum de Biotecnologia 03 - Enzimas Industriais e Especiais. Rio de Janeiro, RJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2006.
- Couto, S. R., Toca-Herrera, J. L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, v.25, n.6, p.558-69. 2007.
- Cui, F. J., Li, Y., Xu, Z. H., Xu, H. Y., Sun, K., Tao, W. Y. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology. *Bioresource Technology*, v.97, n.10, p.1209-16. 2006.
- EP0278355. Patente de invenção. Heim, J., Gysler, C., Visser, J., Kester H., Corneles, M. (Inventores). Ciba Geigy Ag (Depositante). *Novel expression system*. 1988.
- Falkoski, D. L., Guimarães, V. M., Queiroz, M. V., Araújo, E. F., Almeida, M. N., Barros, E. G., Rezende, S. T. Covalent immobilization of  $\alpha$ -galactosidase from *Penicillium griseoroseum* and its application in oligosaccharides hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.XX, p.XX. 2008.
- Ferreira, G. *Produção de patulina por Penicillium spp.* (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000. 54p.
- Gonçalves, D.B. *Produção de pectina liase por uma linhagem recombinante de Penicillium griseoroseum e processamento de suco de frutas pelo extrato enzimático* (Monografia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006. 41p.
- Gummadi, S. N., Kumar, D. S. Batch and fed batch production of pectin lyase and pectate lyase by novel strain *Debaryomyces nepalensis* in bioreactor. *Bioresource Technology*, v.99, n.4, p.874-81. 2008.
- Gummadi, S. N., Kumar, D. S. Microbial pectic transeliminases. *Biotechnology Letters*, v.27, n.7, p.451-8. 2005.
- Hadj-Taieb, N., Ayadi, M., Khlif, M., Mrada, K., Hassairi I., Gargouri, A. Fermentor production of pectinases on gruel, a local by-product and their use in olive oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.1072-1076. 2006.

- Hadj-Taieb, N., Ayadi, M., Trigui, S., Bouabdallah, F., Gargouri A. Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.30, n.5, p.662-666. 2002.
- Hajji, M., Rebai, A., Gharsallah N., Nasri, M. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008.
- Hiss, H. Cinética de processos bioquímicos. In: Schmidell, W, Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W. (Ed.). *Biotecnologia industrial*. São Paulo, SP: Edgard Blücher, v.2, 2001, p.247.
- Ikeda, Y., Hayashi, H., Okuda, N., Park, E. Y. Efficient cellulase production by the filamentous fungus *Acremonium cellulolyticus*. *Biotechnology progress*, v.23, n.2, p.333-8. 2007.
- Jayani, R. S., Saxena, S., Gupta, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, v.40, n.9, p.2931-2944. 2005.
- Johnson, H., Whiteford, J. R., Eckert, S. E., Spanu, P. D. Production and secretion of *Aspergillus nidulans* catalase B in filamentous fungi driven by the promoter and signal peptide of the *Cladosporium fulvum* hydrophobin gene *hcf-1*. *Current genetics*, v.44, n.3, p.155-63. 2003.
- Kammoun, R., Naili, B., Bejar, S. Application of a statistical design to the optimization of parameters and culture medium for alpha-amylase production by *Aspergillus oryzae* CBS 819.72 grown on gruel (wheat grinding by-product). *Bioresource Technology*, v.99, n.13, p.5602-5609. 2008.
- Kapoor, M., Kuhad, R. C. Improved polygalacturonase production from *Bacillus* sp. MG-cp-2 under submerged (SmF) and solid state (SSF) fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, v.34, n.5, p.317-22. 2002.
- Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, v.77, n.3, p.215-27. 2001.

- Kunamneni, A., Singh, S.. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of maize starch for higher glucose production. *Biochemical Engineering Journal*, v.27, n.2, p.179-190. 2005.
- Le Duy, A., Zajic, J. E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: applied to a growth and product formation. *Biotechnology and Bioengineering*, v.15, p.805–810. 1973.
- Li, Y., Cui, F. J., Liu, Z. Q., Xu, Y. Y., Zhao, H. Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, n.5, p.1381-1388. 2007.
- Lotfy, W. A., Ghanem, K. M., El-Helow, E. R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, v.98, n.18, p.3470-7. 2007.
- Metwally, M. Glucoamylase production in continuous cultures of *Aspergillus niger* with special emphasis on growth parameters. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.14, p.113-118, 1998.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428. 1959.
- Neto, B. B., Scarmínio, I. S., Bruns, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Campinas, SP: Editora da Unicamp. 2003. 401p.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., Assavanig, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*, v.70, n.4, p.571-578. 2005.
- Ozer, E. A., Ibanoglu, S., Ainsworth, P., Yagmur, C. Expansion characteristics of a nutritious extruded snack food using response surface methodology. *European Food Research and Technology*, v.218, n.5, p.474-479. 2004.
- Pakula, T. M., Salonen K., Uusitalo, J., Penttila, M. The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Microbiology*, v.151, p.135-43. 2005.



- Papagianni, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, v.22, p.189-259. 2004.
- Patil, S. R., Dayanand, A. Optimization of process for the production of fungal pectinases from deseeded sunflower head in submerged and solid-state conditions. *Bioresource Technology*, v.97, n.18, p.2340-4. 2006.
- Pereira, J. F., Queiroz, M. V., Lopes, F. J., Rocha, R. B., Daboussi, M. J., Araújo, E. F. Characterization, regulation, and phylogenetic analyses of the *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase gene and its use as selection marker for homologous transformation. *Canadian Journal of Microbiology*, v.50, p.11, p.891-900. 2004.
- PI0502515-0. Depósito de pedido de patente. Araújo, E. F., Silva, D. O., Queiroz, M. V., Cardoso, P. G. (Inventores). Universidade Federal de Viçosa (Depositante). *Linhagem recombinante de Penicillium griseoroseum geneticamente modificada com aumento na produção de pectina liase*. 2005.
- PI0705573-0. Depósito de pedido de patente. Araújo, E. F., Queiroz, M. V., Teixeira, J. A., Gonçalves, D. B., Bazzolli, D. M. S., Ribon, A. O., Ribeiro, J. B. (Inventores). Universidade Federal de Viçosa (Depositante). *Linhagem recombinante geneticamente modificada Penicillium griseoroseum T20 com maior produção de pectina liase e poligalacturonase, cassetes de expressão para a construção da linhagem recombinante, preparação enzimática e processo para produção da preparação enzimática*. 2007.
- Piccoli-Valle, R. H., Brandi, I. V., Silva, D. O., Passos, F. J. V. P. Pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum* grown in sugar cane juice in repeated batch cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.17, p.433-437. 2001a.
- Piccoli-Valle, R. H., Passos, F. M. L., Passos, F. J. V. P., Silva, D. O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.32, p.135-140. 2001b.
- Piccoli-Valle, R.H., Passos, F.J.V., Brandi, I.V., Peternelli, L.A., Silva, D.O. Influence of different mixing and aeration regimens on pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*. *Process Biochemistry*, v.38, p.849-854. 2003.

- Pimenta, C. J. *Inovação para a indústria de sucos*. Programa de Incentivo à Inovação (PII). Lavras, MG: Universidade Federal de Lavras. 2006.
- Radoi, F., Kishida, M., Kawasaki H. Characteristics of wines made by *Saccharomyces* mutants which produce a polygalacturonase under wine-making conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.69, n.11, p.2224-6. 2005.
- Rai, P., Majumdar, G. C., Dasgupta, S., De S. Optimizing pectinase usage in pretreatment of mosambi juice for clarification by response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v.64, n.3, p.397-403. 2004.
- Rajmohan, S., Dodd, C. E. R., Waites, W. M. Enzymes from isolates of *Pseudomonas fluorescens* involved in food spoilage. *Journal of Applied Microbiology*, v.93, p.205-213. 2002.
- Ribeiro, J.B. *Produção de poligalacturonase por linhagens recombinantes de Penicillium griseoroseum* (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005. 106p.
- Ribon, A. O. B., Coelho, J. L. C., Barros, E.G., Araújo, E. F. Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Penicillium griseoroseum*. *Biotechnology Letters*, v.21, n.5, p.395-399. 1999.
- Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. Structural organization of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*. *Genetics and Molecular Biology*, v.25, n.4, p.489-493. 2002a.
- Ribon, A. O. B., Queiroz, M. V., Coelho, J. L. C., Araújo, E. F. Differential expression of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum* in different carbon sources. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.29, n.3, p.145-8. 2002b.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A.; Mohnen, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, v.57, p.929-967, 2001.
- Schmidell, W, Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W., Eds. *Biotecnologia industrial*. São Paulo, SP: Edgard Blücher, v.2, 539p., Engenharia bioquímica. 2001.
- Schols, H. A., Voragen, A.G.J. Structure elucidation using enzymes. In: Visser, J., Voragen, A.G.J. (Eds.) *Pectins and pectinases*. Amsterdam: Elsevier, v.14, 1996. Progress in Biotechnology. p.3-18.

- Shiba, Y., Ono, C., Fukui, F., Watanabe, I., Serizawa, N., Gomi, K., Yoshikawa, H. High-level secretory production of phospholipase A1 by *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.65, n.1, p.94-101. 2001.
- Shieh, C. J., Lai, Y. F. Application of response surface methodology to the study of methyl glucoside polyester synthesis parameters in a solvent-free system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, n.4, p.1124-8. 2000.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v.150, p.76–85. 1985.
- Stemke, D. J. Genetically Modified Microorganisms. In: Parekh, S. R. (Ed.). *The Gmo Handbook: Genetically Modified Animals, Microbes, and Plants in Biotechnology*. Humana Press. 2004. Biosafety and Ethical Issues, p.85-132.
- Tavares, A. P. M., Coelho, M. A. Z., Coutinho, J. A. P., Xavier, A. B. R. Optimization and modelling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.134, p.233-248. 2006.
- Teixeira, J. A. *Obtenção e caracterização de linhagens recombinantes de Penicillium griseoreoseum com alta produção de pectina liase e poligalacturonase* (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. 70p.
- Teixeira, J. A. *Produção de pectina liase em biorreator pela linhagem recombinantes 105 de Penicillium griseoreoseum* (Monografia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004. 27 p.
- Trupkin, S., Levin, L., Forchiassin, F., Viale, A. Optimization of a culture medium for ligninolytic enzyme production and synthetic dye decolorization using response surface methodology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.30, n.12, p.682-90. 2003.
- US2003032161. Depósito de pedido de patente. Borneman, W. S., Bower, B. S. (Inventores). *Esterase enzymes, DNA encoding esterase enzymes and vectors and host cells incorporating same*. 2003.

- US6159718. Patente de invenção. Henrik, D., Nonboe, A. L., Venke, K. L., Sakari, K. M., Stephan, C., Peter, H-H H., Torben, H. (Inventores). Novo Nordisk AS (Depositante). *Enzyme with polygalacturonase activity*. 2000.
- US6602696. Patente de invenção. Maria, F. M., Theres, G. C. M., Adriana, H. M., Alber, M. P. J., Jos, J. O. A. J., Joseph, V. A. J. (Inventores). DSM NV (Depositante). *Aspergillus tubigensis polygalacturonase*. 2003.
- Vats, P., Sahoo, D. K., Banerjee, U. C. Production of phytase (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolase) by *Aspergillus niger* van Teighem in laboratory-scale fermenter. *Biotechnology Progress*, v.20, n.3, p.737-43. 2004.
- Visôto, L. E. *Produção de ocratoxina A por fungos filamentosos isolados de café e por fungos produtores de pectinases* (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003. 43p.
- Vivan, J. *Produção da micotoxina citrinina por Penicillium spp* (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002. 42p.
- Wang, L., Ridgway, D., Gu, T., Moo-Young, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances*, v.23, n.2, p.115-29. 2005.
- WO03012071. Patente de invenção. Bo, J., Reginald, S., Terry, R., Howard, B. (Inventores). Elitra Pharmaceuticals Inc, Jiang Bo, Storms Reginald, Roemer Terry, Bussey Howard (Depositantes). *Nucleic acids of Aspergillus fumigatus encoding industrial enzymes and methods of use*. 2003.
- Zhang, X. M., Li, Y., Zhuge, B., Tang, X. M., Shen, W., Rao, Z. M., Fang, H. Y., Zhuge, J. Optimization of 1,3-propanediol production by novel recombinant *Escherichia coli* using response surface methodology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.81, n.6, p.1075-1078. 2006.