

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**Seleção de isolados de *Macrophomina phaseolina* produtores de hidrolases e  
purificação parcial de complexos enzimáticos lipolíticos através de  
fracionamento com espuma**

CLAUDIA SCHINKE

Farmacêutica Bioquímica de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Germani

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Abril, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**Seleção de isolados de *Macrophomina phaseolina* produtores de hidrolases e  
purificação parcial de complexos enzimáticos lipolíticos através de  
fracionamento com espuma**

CLAUDIA SCHINKE

Farmacêutica Bioquímica de Alimentos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Germani

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Abril, 2013

Tese de Doutorado defendida por Claudia Schinke e aprovada em 22 de abril de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

---

Prof. Dr. SABRINA PINTO SALAMONI

---

Dr. PRISCILA BRASIL DE SOUZA CRUZ

---

Prof. Dr. SUELI TERESINHA VAN DER SAND

---

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ CARLOS GERMANI

*Aos meus pais, em memória;*

*A Robert e Thomas, filhos fonte de minha inspiração;*

*A Daniel, desde sempre companheiro.*

## Agradecimentos

Agradecer é um momento que nos traz muita satisfação. O difícil é se lembrar de todos aqueles que contribuíram de alguma forma durante esta prazerosa jornada.

Acima de tudo, agradeço a Deus, pela infinita misericórdia.

E à Vida, fonte inesgotável de oportunidades.

Sinceros agradecimentos, também, ao Prof. Dr. José Carlos Germani, por ter acreditado, naquele longínquo setembro de 2008, que eu seria capaz e pelo seu apoio e orientação ao longo de todo o caminho.

Aos professores do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Faculdade de Farmácia e do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, por contribuírem para o meu crescimento intelectual, e, em especial, aos Prof. Dr. Alexandre José Macedo, Prof. Dr. Adriano Brandelli e Dr. Priscila Brasil de Souza Cruz, pelas valiosas sugestões apontadas no exame de qualificação.

Agradeço igualmente ao Prof. Dr. Sami J. Micherref, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao Prof. Robert Weingart Barreto, da Universidade Federal de Viçosa, e ao colega Dr. Igor Villela Marroni, por gentilmente cederem amostras do microrganismo. Meus agradecimentos também ao Prof. Dr. Ralf Günther Berger e à Dra. Diana Linke da Leibniz University of Hannover, pela cordial acolhida e numerosas sugestões relativas ao método do fracionamento.

Aos colegas de laboratório, agradeço as trocas de ideias, os incentivos, a comemoração das vitórias - sinais de amizade que valorizam nossa existência como seres humanos.

Aos meus amores - os filhos e o marido - pela compreensão, ajuda e apoio incondicional em todos os momentos. À minha querida irmã, cujo auxílio inestimável se fez presente sempre.

À CAPES, pelos recursos financeiros que possibilitaram realizar este trabalho.

Minha gratidão a cada um deles na forma de um público e coletivo “Muito Obrigado!”.

*"O mais importante da vida não é a situação em que estamos,  
mas em que direção nos movemos."*

*Oliver Wendell Holmes*

## RESUMO

*Macrophomina phaseolina*, fungo filamentosso fitopatogênico pertencente ao filo Ascomycota, apresenta ampla distribuição geográfica em climas quentes e secos. No Brasil, é encontrado do Nordeste até o Sul. Por causar sérias perdas na produção agrícola, é bastante estudado visando descobrir e combater seus mecanismos de patogenicidade. Porém, muito pouco se conhece quanto à sua capacidade para produzir biomoléculas – mais especificamente, enzimas - de potencial uso industrial. Treze isolados de *M. phaseolina*, coletados em diversas regiões brasileiras, foram cultivados em meio semi-sólido contendo diferentes substratos para determinar sua velocidade de crescimento radial e verificar a produção de hidrolases pectinolíticas, amilolíticas, proteolíticas e lipolíticas, com o objetivo de identificar aquele(s) de rápido crescimento em cada substrato e produtores da correspondente hidrolase. Dez isolados produziram todas as hidrolases verificadas. A velocidade de crescimento sobre pectina cítrica foi significativamente mais alta ( $p < 0,05$ ) e a velocidade de crescimento sobre os diferentes substratos permitiu selecionar CMM 2105, CMM 1091 e PEL como os isolados de rápido crescimento sobre todos os substratos. A atividade lipolítica específica do isolado PEL, determinada a 37 °C pH 8, foi significativamente mais elevada na comparação com outros três isolados após 96 h de cultivo em meio líquido contendo azeite de oliva, indicando o potencial de seus complexos lipolíticos para uso em detergentes fracamente alcalinos. O cultivo de CMM 2105, MMBF 0410 e PEL em meio líquido contendo azeite de oliva, sob diferentes pH, temperatura e tempo de incubação, indicou que MMBF 0410 apresentou a mais elevada atividade lipolítica e as melhores condições de cultivo foram 30 °C, pH 5,5, com 72 h de incubação. Porém, quando MMBF 0410 foi cultivado sob as melhores condições em meio líquido contendo Tween 80, mostrou atividade lipolítica menor. A atividade dos caldos foi testada a 45 °C, pH 8, por 30 min, evidenciando o potencial uso dos complexos lipolíticos em detergentes fracamente alcalinos em temperaturas médias. O sobrenadante de caldo de cultivo de MMBF 0410 em meio líquido contendo Tween 80 foi submetido ao fracionamento com espuma utilizando ar sob vários fluxos em estágios e adição escalonada de Triton X-100. As frações de espumado mais concentradas em complexos enzimáticos lipolíticos apresentaram atividade a 45 °C, pH 8, recuperação e enriquecimento da atividade lipolítica de 45 % e 34,7, respectivamente, e purificação de 2,9. Foram detectadas lipases no espumado.

**Palavras-chave:** *enzimas; velocidade de crescimento radial; atividade lipolítica; fracionamento com espuma.*

## ABSTRACT

*Macrophomina phaseolina*, phylum Ascomycota, is a phytopathogenic fungus distributed worldwide in hot dry areas. In Brazil, it is found from the Northeast to the South region. It causes severe losses in crops production and is the subject of much research to discover and fight its pathogenic mechanisms. However, little is known about its capacity to produce biomolecules, specifically enzymes, of potential industrial use. Thirteen *M. phaseolina* isolates collected in different Brazilian regions were screened for fast-growth and the production of hydrolases of industrial interest. Hydrolase detection and growth rate determination were tested on citric pectin, gelatin, casein, soluble starch, and olive oil as substrates. Ten isolates were active on all substrates tested. The growth rate on pectin was significantly higher ( $P < 0.05$ ), while the growth rates on the different media identified CMM 2105, CMM 1091, and PEL as the fastest growing isolates. Compared to other three isolates, the specific lipolytic activity of PEL was significantly higher at 96 h when cultivated in liquid medium containing olive oil. The broth was active at 37 °C, pH 8, indicating potential use of its lipolytic enzymes in mild alkaline detergents. Isolates CMM 2105, MMBF 0410 and PEL, cultivated in liquid medium with olive oil, under different pH and incubation temperatures and time showed that the highest lipolytic activity was achieved with MMBF 0410 and the best conditions were 30 °C, pH 5.5, with 72 h of incubation. Activities of the broths were tested at 45 °C, pH 8 for 30 min, evidencing the potential use of the lipolytic complexes in mild alkaline detergents at medium temperature range. However, when MMBF0410 was cultured under these same best conditions in liquid medium with Tween 80 a lower level of lipolytic activity developed. Culture supernatant of MMBF 0410 cultivated in liquid medium with Tween 80 was submitted to foam fractionation with air using several gas flows in stages and stepwise addition of Triton X-100. The most concentrated foamate fractions displayed lipolytic activity at 45 °C, pH 8, activity recovery and enrichment of 45 % and 34.7, respectively, and purification of 2.9. Lipases were present in the foamate.

**Keywords:** *enzymes; radial growth rate; lipolytic activity; foam fractionation.*



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Picnídeos de <i>Macrophomina phaseolina</i> . . . . .	21
<b>Figura 2.</b> Características morfológicas, quanto à textura, das colônias de <i>M. phaseolina</i> cultivados em ágar batata-dextrose . . . . .	22
<b>Figura 3.</b> Características morfológicas, quanto à cor, das colônias de isolados de <i>M. phaseolina</i> em ágar batata-dextrose . . . . .	23
<b>Figura 4.</b> Vendas globais no mercado de enzimas industriais de 2009 a 2011 e projeção para 2016 . . . . .	32
<b>Figura 5.</b> Modo de ação das pectinases sobre uma molécula de pectina. . .	35
<b>Figura 6.</b> Estrutura dos resíduos de glicose na molécula de amilopectina. . .	37
<b>Figura 7.</b> Termos sinônimos para alguns tipos de enzimas proteolíticas. . . .	39
<b>Figura 8.</b> Estrutura da lipase de <i>Mucor miehei</i> na conformação fechada e aberta. . . . .	42
<b>Figura 9.</b> Mecanismo de ação de uma lipase na hidrólise ou na síntese de ésteres carboxílicos. . . . .	43
<b>Figura 10.</b> Métodos de separação por adsorção em bolhas. . . . .	55
<b>Figura 11.</b> Equipamento de fracionamento com espuma. . . . .	57
<b>Figura 12.</b> Fenômenos físicos durante o fracionamento com espuma. . . . .	60
<b>Figura 13.</b> Bolhas poliédricas em espumas e a sucção das bordas Plateau. .	63
<b>Figura 14.</b> Modos de operação de colunas de fracionamento com espuma. . .	70
<b>Figura 15.</b> Morfologia das colônias de <i>Macrophomina phaseolina</i> em ágar batata-dextrose cultivadas a 30 °C por 7 dias. . . . .	83
<b>Figura 16.</b> Influência do pH, temperatura e tempo de incubação na atividade lipolítica extracelular de <i>M. phaseolina</i> em meio mineral líquido contendo azeite de oliva. . . . .	85
<b>Figura 17.</b> Atividade lipolítica (A) e atividade lipolítica específica (B) das frações obtidas na precipitação de caldo de cultivo de <i>M. phaseolina</i> , utilizando tampões de diversos pH. . . . .	86

**Figura 18.** Atividade lipolítica de amostras de espumado de caldo de cultivo de *M. phaseolina* sobre triacilgliceróis de azeite de oliva em placa de rodamina B. .... 87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Produção e perdas de soja devido a patógenos diversos e <i>Macrophomina phaseolina</i> . . . . .	19
<b>Tabela 2.</b> Objetivos das etapas de purificação . . . . .	47
<b>Tabela 3.</b> Vantagens e desvantagens de alguns processos de cromatografia líquida para a purificação de proteínas . . . . .	51
<b>Tabela 4.</b> Ponto isoelétrico de enzimas e seu pH de máxima recuperação durante o fracionamento com espuma. . . . .	65
<b>Tabela 5.</b> Enzimas concentradas e/ou purificadas por fracionamento com espuma . . . . .	73
<b>Tabela 6.</b> Isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> e procedência das amostras . . . . .	77
<b>Tabela 7.</b> Tampões utilizados na precipitação e na ressolubilização das proteínas do caldo de cultivo de <i>Macrophomina phaseolina</i> . . . . .	79
<b>Tabela 8.</b> Morfologia das colônias de <i>M. phaseolina</i> em ágar batata-dextrose após 7 dias de cultivo a 30 °C . . . . .	82

## SUMÁRIO

RESUMO.....	Vii
ABSTRACT .....	Viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
1 Introdução .....	16
2 <i>Macrophomina phaseolina</i> .....	18
2.1 Importância econômica .....	18
2.2 Distribuição geográfica .....	20
2.3 Taxonomia .....	20
2.4 Características morfológicas .....	21
2.5 Patogenicidade .....	24
2.6 Atividade enzimática na patogenicidade .....	24
2.6.1 Celulases e hemicelulases .....	25
2.6.2 Pectinases .....	26
2.6.3 Amilases .....	27
2.6.4 Proteases .....	28
2.6.5 Lipases e esterases .....	29
3 Uso industrial de enzimas microbianas .....	30
3.1 Mercado mundial de enzimas .....	31
3.2 Hidrolases .....	32
3.3 Aplicação industrial das hidrolases microbianas .....	34
3.3.1 Pectinases .....	34
3.3.2 Amilases .....	37
3.3.3 Proteases .....	39

3.3.4 Lipases e esterases .....	41
4 Purificação de enzimas .....	45
4.1 Métodos de purificação .....	48
4.1.1 Precipitação .....	49
4.1.2 Ultrafiltração .....	49
4.1.3 Cromatografia líquida .....	50
4.1.3.1 Filtração em gel ou exclusão molecular .....	52
4.1.3.2 Troca iônica .....	52
4.1.3.3 Interação hidrofóbica .....	53
4.2 Fracionamento com espuma .....	54
4.2.1 Adsorção de moléculas na interface líquido-gás .....	60
4.2.2 Estabilidade da espuma .....	63
4.2.3 Efeito do pH .....	64
4.2.4 Efeito da concentração de proteína .....	65
4.2.5 Aditivos .....	66
4.2.6 Dimensionamento do equipamento .....	67
4.2.7 Efeito do gás .....	68
4.2.8 Nível de líquido .....	69
4.2.9 Efeito do tamanho das bolhas .....	69
4.2.10 Modos de fracionamento .....	70
4.2.11 Aplicações .....	72
JUSTIFICATIVA .....	74
OBJETIVO GERAL .....	75
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	75
CAPÍTULO II – ESTUDOS PRELIMINARES E COMPLEMENTARES .....	76
1 Material .....	76
1.1 Reagentes e equipamentos .....	76

1.2 Isolados de <i>Macrophomina phaseolina</i> . . . . .	76
2 Métodos . . . . .	78
2.1 Características morfológicas das colônias . . . . .	78
2.2 Efeito do pH, temperatura e tempo de incubação sobre o desenvolvimento da atividade lipolítica extracelular em meio líquido . . . . .	78
2.3 Precipitação isoelétrica . . . . .	78
2.4 Determinação da atividade lipolítica de amostras líquidas. . . . .	79
2.5 Determinação da concentração proteica . . . . .	80
2.6 Determinação qualitativa da atividade lipolítica . . . . .	80
3 Resultados e discussão . . . . .	81
3.1 Características morfológicas das colônias . . . . .	81
3.2 Efeito do pH, temperatura e tempo de incubação sobre o desenvolvimento da atividade lipolítica extracelular em meio líquido . . . . .	84
3.3 Precipitação isoelétrica e atividade lipolítica das frações. . . . .	86
3.4 Atividade lipolítica qualitativa . . . . .	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	88
CAPÍTULO III – PUBLICAÇÕES . . . . .	101
1 Artigo publicado no International Microbiology . . . . .	101
2 Artigo aceito no Enzyme Research . . . . .	120
3 Resumos publicados . . . . .	142
3.1 9th Euro Fed Lipid Congress, 2011 . . . . .	142
3.2 Society for Industrial Microbiology 61st Annual Meeting, 2011. . . . .	144
3.3 9 SLACA – Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2011 . . . . .	145
3.4 16th. IUFOST – World Congress of Food Science and Technology, 2012 . . . . .	146
3.5 10th Euro Fed Lipid Congress, 2012 . . . . .	147

CAPÍTULO IV – PERSPECTIVAS .....	148
----------------------------------	-----

## CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1 Introdução

Muito embora o termo “biotecnologia branca” tenha sido cunhado há apenas pouco mais de duas décadas para denominar a produção biotecnológica de compostos químicos utilizando enzimas e microrganismos, muitas empresas foram incorporando, ao longo dos últimos 40 anos, a biotecnologia na produção de vários insumos para as indústrias química, agroquímica, de alimentos, farmacêutica, energia e meio ambiente. O motivo dessa mudança de patamar tecnológico - da tecnologia “fogo e aço” para aquela das reações em condições brandas de pH, temperatura e pressão – deve-se aos evidentes ganhos que a mesma oferece. Microrganismos e enzimas são biocatalisadores capazes de transformar grande diversidade de substratos, ou mostrarem-se altamente específicos, frequentemente com régio e enantiosseletividade. Além disso, as reações enzimáticas ocorrem em meio aquoso. Por esse motivo, a biotecnologia branca se une à “química verde” dos processos químicos eco-amigáveis e aos processos produtivos que favorecem o desenvolvimento sustentável, todos estes pré-requisitos para o desenvolvimento de atividades no atual ambiente globalizado.

A tecnologia baseada em enzimas é um campo interdisciplinar, reconhecido pela Organização para o Desenvolvimento e a Cooperação Econômica (ODCE) como componente importante para o crescimento industrial sustentável. O seu uso abrange desde a aplicação direta em processos industriais, até a descoberta de novos fármacos e sua elaboração.

A maioria das enzimas envolvidas no metabolismo microbiano não é conhecida, apesar do mapeamento praticamente completo do genoma do microrganismo. Algumas foram recém-descobertas e, apesar de seu potencial na síntese de biomoléculas, ainda estão em fase de caracterização bioquímica. Assim, a escolha de um biocatalisador apropriado para o desenvolvimento de um processo industrial muitas vezes esbarra nas limitadas opções disponíveis. Porém, a disponibilidade de um determinado biocatalisador é determinante na viabilidade de



um processo biotecnológico. Assim, ainda há amplo espaço até que seja alcançado o objetivo de utilizar catalisadores naturais para transformar moléculas, especialmente no caso de substratos não-naturais. Neste sentido, as hidrolases apresentam grande potencial, pois são as mais amplamente utilizadas na indústria. As lipases e esterases são especialmente importantes e, devido à sua ampla gama de substratos e à diversidade de reações que catalisam, têm inúmeras aplicações tecnológicas na área da química fina, bioenergia, produtos farmacêuticos, alimentos e detergentes, áreas nas quais cada aplicação requer uma enzima de características bem específicas e há demanda por novas opções.

Devido à alta diluição apresentada pela maioria dos produtos obtidos através da biotecnologia, o processo de purificação ou *downstream*, isto é, o processamento subsequente à obtenção do bioproduto, representa cerca 50 % dos custos totais do produto final. O valor do produto final, sua pureza e campo de aplicação, bem como a escala de produção, influenciam diretamente na estratégia do *downstream*. Portanto, o sucesso da tecnologia baseada em enzimas depende em grande medida do desenvolvimento de processos de biosseparação que sejam eficientes e de baixo custo na recuperação e purificação do bioproduto. Apesar desta necessidade ser amplamente reconhecida, há relativamente poucos métodos disponíveis para aplicação na indústria. O desenvolvimento de novos métodos para a separação e recuperação de componentes em soluções diluídas torna-se essencial para diminuir a dependência dos caros processos cromatográficos e térmicos atualmente utilizados.

Recentemente, o genoma de *Macrophomina phaseolina* foi integralmente sequenciado e foi descrito pelos pesquisadores como “ferramenta para matar” (ISLAM et al., 2012). A descrição não é exagerada quando se verifica a amplitude de espécies vegetais suscetíveis a esse patógeno não específico, capaz inclusive de infectar animais e seres humanos. Assim, presumir que *M. phaseolina* dispõe de um arsenal bioquímico diversificado e poderoso, do qual é possível obter diversas biomoléculas para aplicações industriais, é uma hipótese razoável.

## 2 *Macrophomina phaseolina*

### 2.1 Importância econômica

*Macrophomina phaseolina* é o fungo fitopatogênico que causa a doença denominada “podridão negra da raiz” ou “podridão cinzenta do caule”. Infecta mais de 600 espécies diferentes de plantas entre elas soja, mamona, algodão, amendoim, milho, girassol, sorgo, feijão, trigo, cucurbitáceas e juta (USDA, Agricultural Research Service, Fungal databases). Apesar da importância econômica de várias das culturas atingidas pelo fitopatógeno nos diversos países, são escassos os dados sobre perdas de produção e prejuízos monetários devidos a ele.

Há relatos de perda de produção de 90 % da cultura de girassol (ASLAM *et al.*, 2010) e 100 % do amendoim (AGARWAL *et al.*, 2009) devido a esse patógeno. A podridão do caule causada por *M. phaseolina* é uma das principais doenças da mamona (BELTRÃO *et al.*, 2008), cultura economicamente importante no Nordeste e Sudeste do Brasil devido à produção de biodiesel a partir do óleo de rícino (COLLARES; CHIES, 2012), porém não foram encontrados dados exatos sobre a perda de safra devida ao patógeno.

Entretanto, informações monetário/comerciais são mais comuns sobre a soja, cultura das mais importantes quanto ao volume mundial de produção. Segundo a Soystats (ASA, 2012), uma publicação da American Soybean Association, a safra mundial de soja em 2012 foi de 251 milhões de toneladas, das quais o Brasil produziu 72 milhões, sendo o segundo maior produtor.

A Tabela 1 apresenta a produção de soja ao longo de vários anos, bem como as perdas de produção devido a diversos patógenos e a *Macrophomina phaseolina*. Este último, em 1998, foi a terceira causa mais importante de perdas no mundo, representando 1,25% da produção (WRATHER *et al.*, 2001). No Brasil, este fungo foi responsável por importantes perdas de receita em 1994 e 1998 (WRATHER *et al.*, 1997, 2001) de US\$ 205 e 165 milhões, respectivamente, representando uma média aproximada 3 % da produção. A previsão para a safra de soja a ser colhida

no Brasil em 2013 é de 67 milhões de toneladas (Abiove, 17/04/2013), ao preço de US\$ 535 por tonelada (INDEXMUNDI, 2013). Caso a percentagem média de perdas se repita, representará cerca de US \$ 1,07 bilhão em receitas não realizadas.

Nos EUA, nas safras de soja de 2003, 2004 e 2005, *M. phaseolina* foi o 2º, 11º e 5º mais importante patógeno em cada ano, respectivamente, sendo responsável por perdas acumuladas de US\$ 648 milhões durante esse período. Em 2003 nos EUA, do total de perdas causadas pelos diversos patógenos, 21 % foram devidas a *M. phaseolina* (WRATHER; KOENNING, 2006).

Tabela 1. Produção e perdas de soja devido a patógenos diversos e *Macrophomina phaseolina*.

			1994	1998	2003	2004	2005	2013
Mundial*	Produção		10 <sup>6</sup> ton	137,6 <sup>a</sup>	159,8 <sup>a</sup>	--	--	--
	Perda	Patógenos diversos	10 <sup>6</sup> ton	10,9 <sup>b</sup>	28,5 <sup>c</sup>	--	--	--
			% da produção	7,9	17,8	--	--	--
		<i>M. phaseolina</i>	10 <sup>6</sup> ton	1,23 <sup>b</sup>	2,0 <sup>c</sup>	--	--	--
			% da produção	0,9	1,25	--	--	--
	Brasil	Produção		10 <sup>6</sup> ton	25,9 <sup>a</sup>	31,3 <sup>a</sup>	--	--
Perda		<i>M. phaseolina</i>	10 <sup>3</sup> ton	930 <sup>b</sup>	750 <sup>c</sup>	--	--	2.000
			% da produção	3,6	2,4	--	--	3,0
		Milhões US\$	7,4 <sup>e</sup>	3,96 <sup>e</sup>	--	--	1.070 <sup>g</sup>	
EUA		Perda	Patógenos diversos	10 <sup>6</sup> ton	4,9 <sup>b</sup>	--	9,5 <sup>d</sup>	12,3 <sup>d</sup>
	<i>M. phaseolina</i>		10 <sup>6</sup> ton	0,28 <sup>b</sup>	--	1,9 <sup>d</sup>	0,27 <sup>d</sup>	0,49 <sup>d</sup>
			% do total de perdas	6	--	21	2	7

\*Dez países maiores produtores. <sup>a</sup>USDA, Production, Supply and Distribution Online; <sup>b</sup>WRATHER et al. 1997; <sup>c</sup>WRATHER et al., 2001; <sup>d</sup>WRATHER; KOENNING, 2006; <sup>e</sup>Estimativa baseada na cotação média anual da tonelada (INDEXMUNDI, 2013); <sup>f</sup>Abiove, 17/04/2013; <sup>g</sup>Estimativa baseada na cotação média de março de 2013 (INDEXMUNDI, 2013).

Dados sobre a safra brasileira de soja de 2007/2008 (SARAIVA; LEITE; DE CASTRO, 2009) indicam a produção no Estado do Paraná de 11,9 milhões de toneladas, onde o principal fungo patógeno foi *M. phaseolina*. Em Goiás, no mesmo período, a produção foi de 6,5 milhões toneladas de soja, onde também houve elevada incidência. Diante desse quadro, percebe-se a importância deste microrganismo não somente na agricultura brasileira, mas também em nível mundial.

## 2.2 Distribuição geográfica

*M. phaseolina* tem ampla distribuição geográfica, especialmente em áreas tropicais e subtropicais sujeitas a secas, como na África, Ásia, Europa, Américas do Sul e do Norte (ALMEIDA *et al.* 2003; SERGEEVA *et al.*, 2005; BEAS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2006; ABOSHOSHA *et al.*, 2007; BOKOR, 2007; DAS *et al.*, 2008; EDRAKI; BANIHASHEMI, 2010; ISLAM *et al.*, 2012). No Brasil, pôde ser encontrado desde a região Norte, na parte oriental do Pará e Ilha do Marajó (POLTRONIERI; SILVA; OLIVEIRA, 1992) e Rondônia (FERNANDES; SOUZA; RAMALHO, 2005), na região Nordeste (BATISTA *et al.*, 1996; SALES JUNIOR *et al.*, 2012), onde o clima é quente e seco, até a região Sul (WRATHER *et al.* 1997), sujeita a períodos de seca no verão.

## 2.3 Taxonomia

O fungo filamentoso anamórfico *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. foi descrito pela primeira vez por Tassi em 1901 como *Macrophoma phaseolina*. Desde então microrganismos apresentando características semelhantes foram isolados e classificados em espécies diferentes. Ashby, em 1927, examinou o material desses diversos isolados e concluiu que se tratavam da mesma espécie, classificando-os como *Macrophomina phaseoli* (Maubl.) Ashby. Em 1947, Goidanich revisou a taxonomia dessa espécie e atribuiu-lhe o nome atual, *Macrophomina phaseolina*,

única espécie do gênero (AGARWAL, 2010; CABI/Species Fungorum). Pertence ao filo Ascomycota, família *Botryosphaeriaceae* (CROUS et al., 2006).

## 2.4 Características morfológicas

*M. phaseolina* produz picnídios imersos no meio de cultivo, de cor marrom a negra, de 100 a 250  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A Figura 1A apresenta picnídios de *M. phaseolina* do isolado PEL e a Figura 1B o picnídio rompido e a liberação de conídios.

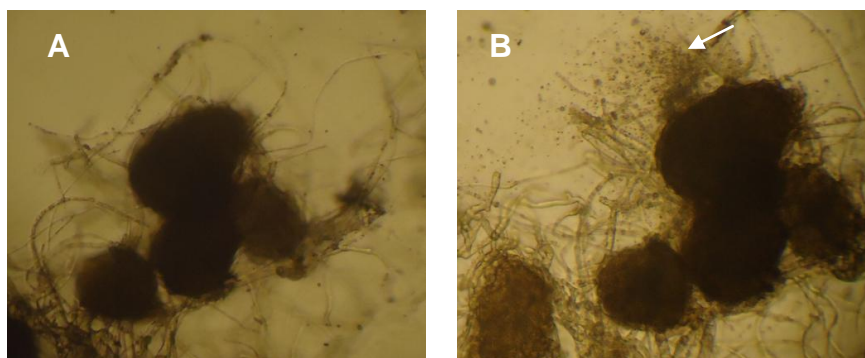


Figura 1. Picnídios de *Macrophomina phaseolina*: A) íntegros; B) após rompimento por pressão, apresentando a liberação de conídios (seta) (fotos: Ribas, A. D.; Schinke, C., 2010).

Os conídios são hialinos, elipsoides a obovóides, de 14 a 30  $\mu\text{m}$  de comprimento (AGARWAL, 2010). Conídios jovens têm o ápice coberto por uma bainha que é pouco visível em preparações com azul de algodão em lactofenol, porém claramente visível utilizando a coloração de Leifson para flagelos. O microrganismo apresenta uma fase não picnidial, durante a qual forma microesclerócios como estrutura de resistência, fase em que é denominado *Rhizoctonia bataticola* (AGARWAL, 2010; MONGA; RAJ, 2000). Esclerócio é uma estrutura dura, persistente, formada por uma massa de hifas compactas, que pode permanecer latente por longos períodos e germinar em condições favoráveis (GUERRERO; SILVEIRA, 2003).

As colônias de *M. phaseolina* apresentam características morfológicas variadas (Figuras 2 e 3). As colônias podem apresentar padrões diferenciados de

crescimento e textura, variando entre micélio denso, esparso, penugento ou compactado, produzindo micélio aéreo em maior ou menor quantidade (EDRAKI; BANIHASHEMI, 2010; ABOSHOSHA et al., 2007; BEAS-FERNÁNDEZ et al., 2006; PRABHU, 2009). As cores podem ser uniformes ou mescladas, sendo as mais comuns preto, cinza e verde escuro, mas também se encontram isolados de cor branca e marrom (MAYEK PÉREZ; CASTAÑEDA; GALLEGOS, 1997; ABOSHOSHA et al., 2007; BEAS-FERNÁNDEZ et al., 2006; PRABHU, 2009).

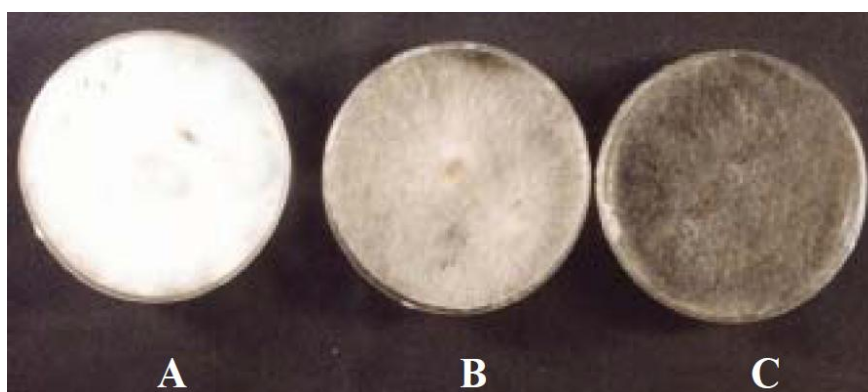


Figura 2. Características morfológicas, quanto à textura, das colônias de isolados de *M. phaseolina* em ágar batata-dextrose: A) penugento; B) parcialmente penugento; C) compactado (EDRAKI; BANIHASHEMI, 2010)

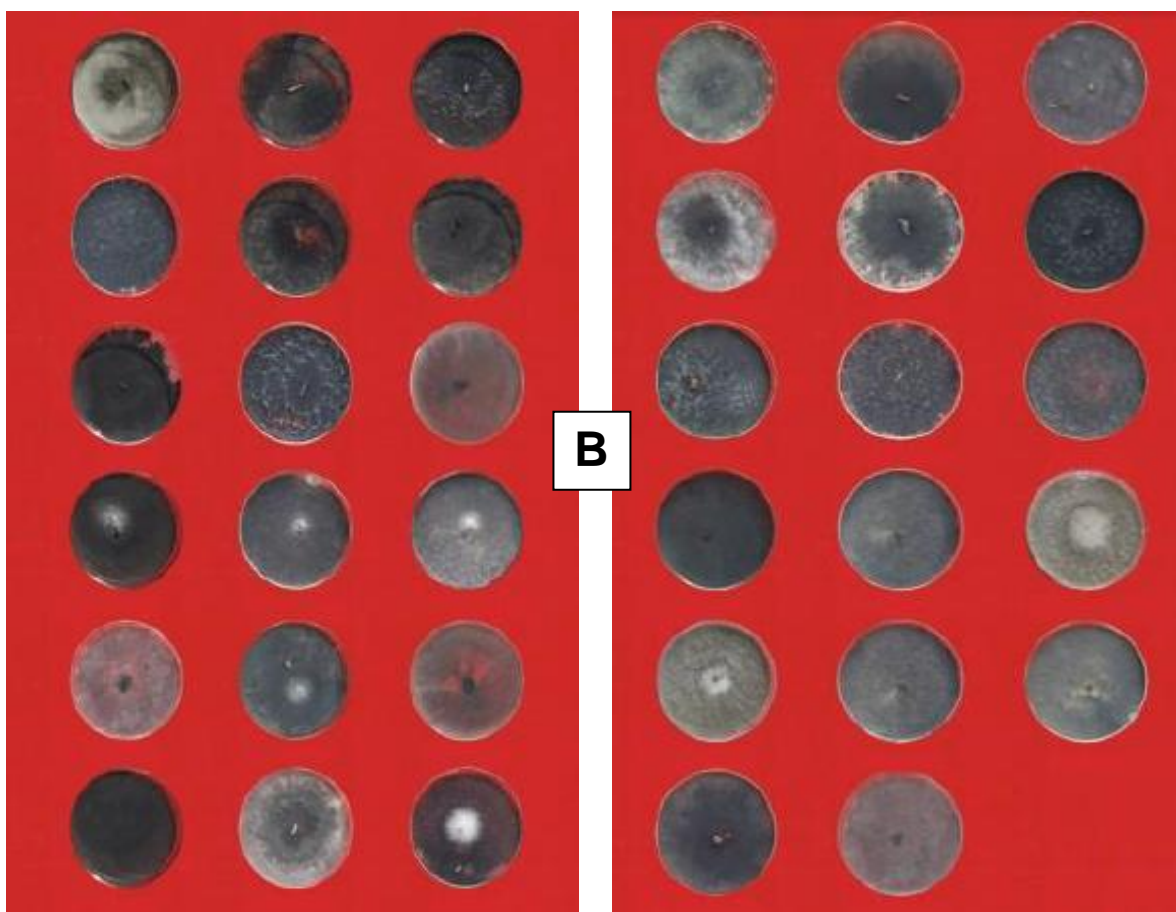
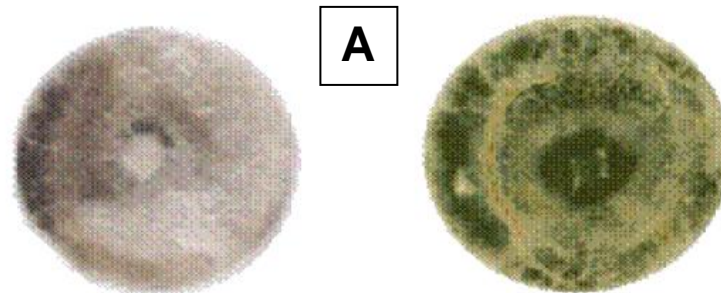
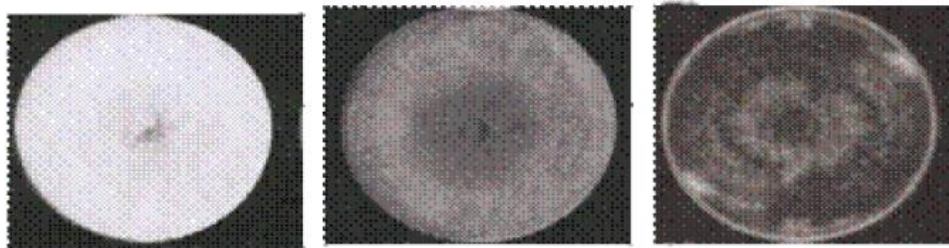


Figura 3. Características morfológicas, quanto à cor, das colônias de *M. phaseolina* cultivadas em ágar batata-dextrose. A) isolados de girassol (ABOSHOSHA et al., 2007). B) isolados de sorgo (PRABHU, 2009).

## 2.5 Patogenicidade

*Macrophomina phaseolina* infecta mais de 600 espécies diferentes de plantas (USDA, Agricultural Research Service, Fungal databases), causando a doença “podridão negra da raiz” ou “do caule”, favorecida por temperatura ambiente alta (30-35 °C) e solo seco (NYVALL, 1999; ISLAM et al, 2012, FARR; ROSSMAN, 2013). A dificuldade em controlá-la deve-se à persistência de seus esclerócios no solo e restos de plantas, os quais podem permanecer viáveis de 2 a 15 anos, mesmo na ausência da planta hospedeira (JANA et al., 2005). A doença latente também pode se desenvolver a partir de sementes infectadas com microesclerócios. Em condições favoráveis, os esclerócios do solo, em contato com as raízes, desenvolvem hifas na extremidade das quais se formam apressórios (AMMON; WYLLIE; BROWN JR., 1975). A pressão mecânica dos apressórios sobre a parede celular vegetal, em conjunto com o abrandamento da parede provocada pela secreção de enzimas pelo patógeno, viabiliza a penetração do microrganismo primeiramente no espaço intercelular e, posteriormente, no interior das células da parede celular. As hifas avançam até o xilema, o conjunto de vasos que conduzem água e sais minerais da raiz às folhas, onde iniciam grande produção de esclerócios, provocando a obstrução dos vasos e causando a murcha e morte da planta (AHMAD; HAMEED; GHAFAR, 2006).

Há também relatos da ação deste microrganismo em animais e seres humanos, causando granuloma subcutâneo em gato (HASEGAWA *et al.*, 2005), infecção de pele em criança imunocomprometida (SRINIVASAN *et al.*, 2009) e infecção ocular humana (BAGYALAKSHMI *et al.*, 2008).

## 2.6 Atividade enzimática na patogenicidade

A parede celular vegetal é uma estrutura complexa de polímeros que circunda a célula, protegendo a membrana celular e o citoplasma. Para a degradação da parede celular e, em seguida, da membrana celular, o fungo produz enzimas



exocelulares celulolíticas, hemicelulolíticas, pectinolíticas, lipolíticas e proteolíticas, as quais são capazes de degradar cada um dos principais componentes poliméricos (AHMAD; HAMEED; GHAFAR, 2006). Recentemente, foi sequenciado e montado 92,8% do genoma de *M. phaseolina* e verificou-se a existência de grande quantidade de genes para a interação patógeno-hospedeiro, incluindo aqueles para adesão, transdução de sinal, degradação da parede celular, biossíntese de purinas e de toxinas. O genoma deste fitopatógeno provê toda uma estrutura dedicada ao processo de infecção em nível citológico e molecular, que utiliza um conjunto de ferramentas enzimáticas e toxigênicas destinadas a destruir a planta hospedeira (ISLAM et al., 2012).

### **2.6.1 Celulases e hemicelulases**

A parede celular vegetal é composta por fibras de celulose e hemicelulose embebidas em uma camada de pectina, cuja função é dar estrutura semirrígida à planta, além de proteção contra patógenos. A celulose é constituída por uma cadeia polimérica não ramificada de  $\beta$ -1,4-D-glicose. A hemicelulose é composta principalmente por cadeias de xiloglicano e arabinoxilano. O xiloglicano possui a cadeia central de glicose semelhante à celulose, porém 3 em cada 4 moléculas de glicose estão ligadas a moléculas de xilose. Arabinoxilano constitui-se de uma cadeia central de  $\beta$ -1,4-D-xilose contendo ramificações de arabinose (COSGROVE, 2005).

Para que um microrganismo possa invadir o vegetal e utilizar-se de seus nutrientes, é necessário que secrete as celulases capazes de hidrolisar os componentes da parede celular. Endoglucanases, enzimas que hidrolisam a celulose ao acaso no interior da cadeia polissacarídica, formam dextroses. As exoglucanases clivam cada segunda ligação glicosídica a partir da ponta da molécula, formando celobiose, um dissacarídeo. A  $\beta$ -glicosidase hidrolisa a celobiose, formando monômeros de glicose, tornando-os disponíveis para a fisiologia do patógeno (KUHAD, GUPTA; SINGH, 2011).

Há muitos estudos sobre enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas por *M. phaseolina*, bem como sobre os genes que as codificam. Em cultivo submerso, o patógeno produziu carboximetilcelulase (ROY; VORA, 1989) de atividade máxima em pH 5,5 e 60 °C. Também foram detectadas  $\beta$ -glicosidases, bem como xilanases e  $\beta$ -xilosidases, enzimas que hidrolisam hemicelulose (ROY; ROY; DUBE, 1984 apud ROY; ROY; VORA, 1993). Em plantas infectadas, foi detectada atividade das enzimas celulase e  $\beta$ -1,3-glucanase endoativas, mas não de xilanase (AFOUDA; WOLF; WYDRA, 2009).

Quando as características morfológicas, a patogenicidade e a presença de genes para endoglucanases foram comparadas entre isolados mexicanos e não-mexicanos (Austrália, Brasil, Itália, EUA) desse fitopatógeno, os resultados sugeriram uma virulência diferenciada nos isolados mexicanos, baseada na sua maior velocidade de crescimento radial e grau de patogenicidade sobre plântulas de feijão, mas esta não pôde ser associada à presença ou ausência dos genes *egl1* e *egl2* (BEAS-FERNÁNDEZ et al., 2006). A clonagem e expressão de *egl1* de *M. phaseolina* em *Escherichia coli* (WANG; JONES, 1995) mostrou que essa  $\beta$ -1,4-endoglucanase mimetiza uma endoglucanase vegetal que é ativa durante a expansão da parede celular. Foi sugerido que, pela mimetização, *M. phaseolina* poderia penetrar de modo sub-reptício na parede celular. Após a expressão de *egl1* em *E. coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, a comparação das atividades enzimáticas revelou atividade ótima a 60 °C e a 40 °C, respectivamente, e pH ótimo de 5.0 para ambas. O estudo conclui que a expressão em *E.coli* é mais apropriada para aumento de escala (WANG; JONES, 1999).

### **2.6.2 Pectinases**

As pectinases, além das celulases e hemicelulases, também apresentam papel importante na penetração de um patógeno no espaço inter e intracelular dos tecidos do hospedeiro. O patógeno, para poder invadir as células, necessita ultrapassar a barreira imposta pela lamela média, uma fina camada de material adesivo extracelular localizado entre as paredes primárias das células de vegetais

superiores. A pectina é o principal componente da lamela média, conferindo firmeza e estrutura aos tecidos vegetais. As pectinases secretadas pelo fungo vão promover a degradação dessa camada, auxiliando na invasão dos tecidos e a consequente murcha do vegetal (AHMAD; HAMEED; GHAFAR, 2006).

As primeiras evidências de atividade pectinolítica de extratos de *M. phaseolina* foram relatadas na década de 1950 (RADHA, 1953). Filtrados de culturas de três isolados demonstraram atividade pectinolítica e, quando aplicados sobre plantas de juta, causaram os mesmos sintomas da doença da podridão do caule, indicando assim a relação entre a presença dessas enzimas e a patogenicidade do fungo (ALI et al., 1969). A análise da atividade enzimática de vários isolados fúngicos causadores de podridão do caule do milho indicou que a atividade pectinolítica de *M. phaseolina* foi máxima em 48 h (AHMAD; HAMEED; GHAFAR, 2006)

### 2.6.3 Amilases

Entre as enzimas amilolíticas produzidas por fungos encontram-se a  $\alpha$ -amilase e a amiloglucosidade. Alfa-amilases são endoamilases e transformam o amido em dextrinas e oligossacarídeos. A amiloglucosidase ou glucoamilase é uma exoamilase que hidrolisa escalonadamente resíduos terminais de glicose a partir do extremo das cadeias  $\alpha$ -1,4-glucano presentes nas dextrinas. Podem também hidrolisar resíduos 1,6, ainda que mais lentamente, gerando uma conversão praticamente completa das dextrinas em glicose (PASTORE, 2002; GOMES et al., 2005). A secreção de amiloglucosidade por *Sclerotia sclerotiorum* (MARTEL et al., 2002) foi considerada uma indicação indireta da potência patogênica do fungo, podendo estar associada à virulência do fitopatógeno para infectar cotilédones de girassol, onde a enzima tem a função de hidrolisar o amido das células atacadas e maceradas, fornecendo energia ao fungo na forma de unidades de glicose.

Amilase de *M. phaseolina*, bem como celulase de *Trichoderma* sp. e pectinase de *Fusarium trincitum*, foram produzidas, parcialmente purificadas e misturadas, sendo utilizadas como suplementação em dietas contendo fibras para

melhorar o ganho de peso de frangos de corte, obtendo-se aumento significativo do peso com o uso das enzimas (ONILUDE; OSO, 1999). Quando *M. phaseolina* foi cultivada utilizando fontes de carbono como amido, milho moído, farelo de banana, casca de soja e semente de jaca moída, detectaram-se amilases com atividade dextrinizante e sacarificante (FERNANDES et al., 2007).

#### 2.6.4 Proteases

Após o fitopatógeno ter degradado a parede celular com pectinases e celulases, a sua disseminação ocorre quando a membrana celular sofre a ação de suas proteases e lipases (AHMAD; HAMEED; GHAFAR, 2006). A membrana celular é uma bicamada lipídica com proteínas inseridas. Algumas proteínas atravessam a extensão completa da membrana, frequentemente criando poros através dos quais ocorre o transporte de nutrientes (SUGIYAMA; POLULYAKH; SHIMIZU, 2003). Uma proteinase de *Botrytis cinerea* foi secretada nos estágios iniciais da infecção, antes mesmo da secreção de enzimas pectolíticas, e foi acompanhada pela morte das células do vegetal (MOVAHEDY; HEALE, 1990 apud VALUEVA; MOSOLOV, 2004). Por outro lado, um mutante não-patogênico de *Plamiodophora brassicae*, patógeno de crucíferas, foi incapaz de produzir cisteína-protease extracelular. Estes mutantes readquiriram a patogênese ao recuperarem a capacidade de produzir essa enzima (BALL et al., 1991 apud VALUEVA; MOSOLOV, 2004).

*Macrophomina sp.* MS 139 cultivada em meio mineral com caseína (SOHAIL et al., 2009) mostrou produção de protease. Em outro experimento, porém, no qual se utilizaram dois isolados do fitopatógeno também cultivados em meio caseína, tanto em placa quanto em meio líquido, estes não apresentaram nenhuma atividade proteolítica (AHMAD; HAMEED; GHAFAR, 2006).

### 2.6.5 Lipases e esterases

As lipases e esterases secretadas pelo fitopatógeno, em conjunto com as proteases, são responsáveis pela degradação da membrana celular vegetal. Os fosfolipídios, constituintes das membranas citoplasmáticas, são hidrolisados, desestruturando a membrana e facilitando a penetração do fitopatógeno no interior na célula (MUSTRANTA; FORSELL; POUTANEN, 1995). Tem sido evidenciado que lipases fúngicas podem agir sobre a cutícula vegetal, hidrolisando seus componentes. A cutícula é formada por uma camada de cutina e ceras que recobre a epiderme da planta, sendo mais espessa nas folhas, cuja função é proteger o vegetal contra a perda de água (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 1992). Quimicamente, a cutina e a cera são compostas por ésteres de ácidos graxos hidroxilados ou epoxidados de cadeias de 16 a 18 carbonos (BIANCHI; BIANCHI, 1990; HEREDIA, 2003).

Uma lipase extracelular de *Botrytis cinerea* foi importante nos estágios iniciais da penetração do fungo através da cutícula das folhas de parreira (COMMÉNIL et al., 1999) e a inativação dessa enzima com anticorpos evitou a infecção de folhas de tomateiro por conídios desse fitopatógeno. A produção de uma lipase por *Fusarium graminearum* foi induzida *in vitro* por substratos lipídicos, bem como foi detectada *in planta* um dia após a infecção de trigo com o patógeno. A suplementação de conídios deste fungo com ebelactone B, um inibidor de lipase, reduziu drasticamente a severidade da infecção quando os mesmos foram inoculados no vegetal (VOIGT; SCHÄFER; SALOMON, 2005), evidenciando assim a importância das lipases na fitopatogenicidade.

A curva de desenvolvimento da produção *in vitro* de celulases, pectinases, proteases e lipases extracelulares por *Cephalosporium acremonium* Samra, Sabet & Hingorani, *Fusarium moniliforme* Sheld., *F. graminearum* Schw., *F. semitectum* Berk. & Rav., *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. isolado 1, *M. phaseolina* isolado 2, *Rhizoctonia solani* Kuhn isolado 1, *R. solani* isolado 2 e *Verticillium albo-atrum* Nees, bem como o desenvolvimento da infecção após inoculação no caule do milho, mostrou que há correlação positiva entre a produção de lipase e a severidade da doença e a perda de rendimento em grãos. Os diferentes tempos decorridos até o

pico de atividade de cada enzima em cada patógeno sugerem que a presença de determinada enzima é importante em momento específico para o desenvolvimento da patogenicidade (AHMAD; HAMEED; GHAFAR, 2006).

### 3 Uso industrial de enzimas microbianas

Enzimas são catalisadores biológicos produzidos pelas células vivas com a função de acelerar reações bioquímicas no processo metabólico celular. São altamente específicas em relação ao seu substrato e, geralmente, são necessárias várias enzimas, em ação conjunta ou em sucessão, para completar a sequência de reações metabólicas realizadas pela célula viva. A aplicação prática e o uso industrial de enzimas datam de muitos séculos antes de sua natureza ou função ser compreendida. O uso da cevada maltada, cujo amido hidrolisado pelas enzimas produzidas durante a germinação do grão serve de fonte de açúcares fermentáveis para o preparo da cerveja, bem como o uso do levedo no pão para tornar a massa leve e macia, são exemplos do emprego, durante séculos, de enzimas em grande escala.

Takamine, no início do século XX, foi o primeiro a visualizar o potencial do cultivo de microrganismos em grande escala para a obtenção de enzimas (UNDERKOFER; BARTON; RENNERT, 1958). Utilizou *Aspergillus oryzae* para obter enzimas amilolíticas, comercializadas no mercado farmacêutico com o nome de “Taka-díastase”.

Desde a década de 1950 descreviam-se as vantagens da utilização de enzimas em processos industriais como sendo (UNDERKOFER; BARTON; RENNERT, 1958):

- i. um processo não tóxico por ser de origem natural;
- ii. de grande especificidade de ação, realizando reações que de outra maneira seriam difíceis de promover;

- iii. de atividade em condições brandas de temperatura e pH, não necessitando de equipamento especial resistente à corrosão, por acidez ou alcalinidade, e a altas temperaturas, usuais em processos químicos;
- iv. de alta velocidade de reação, mesmo em baixa concentração, sendo facilmente controlável pelo ajuste da temperatura, pH e quantidade de enzima empregados;
- v. as enzimas serem facilmente inativadas quando a reação alcançou o ponto desejado.

Devido a essas vantagens, muitas indústrias já então se interessavam em adaptar métodos enzimáticos aos seus processos industriais. Dentre os catalisadores biológicos, as enzimas de origem microbiana apresentam muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal e vegetal, como menor custo, possibilidade de produção em larga escala, suprimento regular e abundante em quantidades constantes, maior estabilidade e amplo espectro de características físico-químicas (CHANDRASEKARAN; KUMAR, 2002).

### **3.1 Mercado mundial de enzimas**

Considerando o campo de aplicação, as enzimas podem ser classificadas em quatro categorias principais, isto é, enzimas para detergentes, para alimentos, para ração animal e enzimas técnicas. Essa última categoria pode ser subdividida em enzimas para têxteis, couro, polpa e papel, bioetanol combustível e outras finalidades (VAN BEILEN; LI, 2002). Das quatro categorias, as enzimas para alimentos constituíram a maior fatia de mercado a partir de 2009. Porém, o aumento do mercado de enzimas técnicas foi maior nos últimos 4 a 5 anos devido ao grande crescimento do segmento de enzimas para a produção de bioetanol, constituindo 11% do mercado global de enzimas industriais em 2009 (KONCEPT ANALYTICS, 2010).

A Figura 4 mostra que, apesar da crise econômica mundial iniciada em 2008, as vendas no mercado mundial de enzimas industriais continuaram a crescer até 2011 e projeta-se que também haja crescimento para os 5 anos seguintes. O

segmento mais importante é o das enzimas para aplicação em alimentos e bebidas (BCC RESEARCH, 2012) e entre as principais enzimas no mercado industrial - amilases, lipases, proteases, ligases, fitase, celulasas e xilanase – todas elas, excetuando as ligases, são hidrolases (KONCEPT ANALYTICS, 2010).

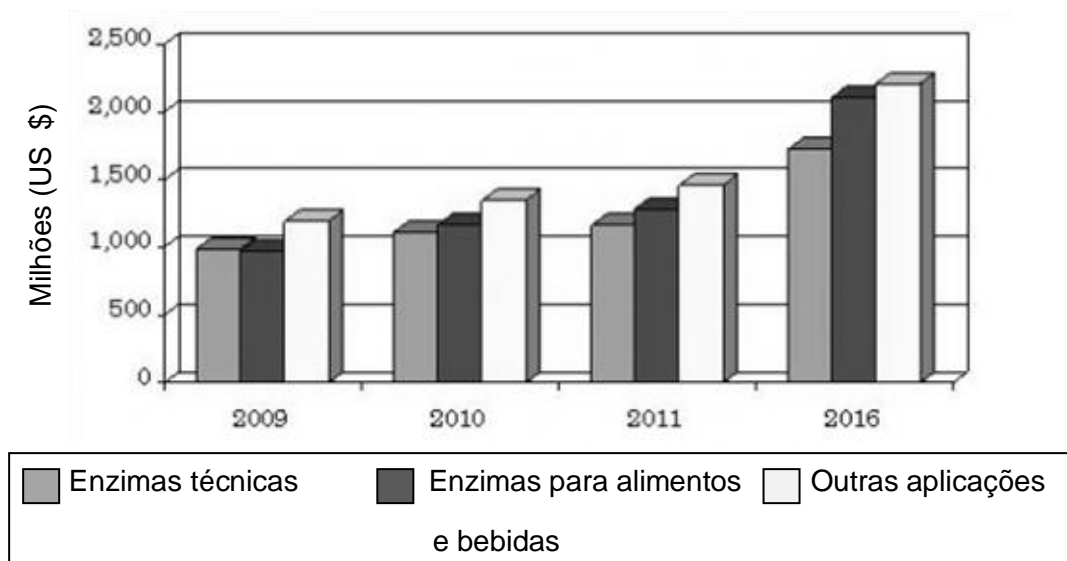


Figura 4. Vendas globais no mercado de enzimas industriais de 2009 a 2011 e projeção para 2016 (BCC RESEARCH, 2012).

### 3.2 Hidrolases

Segundo a International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB, 2013a), as hidrolases são enzimas que catalisam a adição de uma molécula de água a outra molécula, causando o rompimento de vários tipos de ligações. Recebem a classificação EC 3, sendo este grupo subdividido de acordo com o tipo de ligação que hidrolisa:

EC 3.1 - Atuam sobre ligações de ésteres carboxílicos, tioéster, monoéster fosfórico, fosfodiéster, fosfotriéster, bem como as endo- e exonucleases. Exemplos desse grupo, com aplicação industrial, são as carboxilesterases e as lipases.



EC 3.2 – São as glicosilases. Subdividem-se naquelas atuantes sobre glicosídios, rompendo ligações O- e S-glicosil, e aquelas atuantes sobre ligações N-glicosil. A  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, xilanases e celulasas são exemplos com aplicação industrial.

EC 3.3 – Atuam em ligações éter. Exemplo: colesterol-epóxido hidrolase.

EC 3.4 – São denominadas peptidases por hidrolisarem ligações peptídicas. Subdividem-se em exopeptidases, que atuam próximas ao final da cadeia polipeptídica, liberando aminoácidos livres, di- ou tripeptídeos, e em endopeptidases, que atuam internamente na cadeia polipeptídica, produzindo oligopeptídeos. O termo *protease* é sinônimo de *peptidase*, este último recomendado pela IUBMB. Existe grande número de peptidases, que se classificam segundo seu substrato e o mecanismo de ação.

EC 3.5 – Atuam sobre ligações C-N não peptídicas. Hidrolisam amidas e amidinas lineares e cíclicas. Exemplos são as amidases.

EC 3.6 – Atuam sobre anidridos ácidos. Por exemplo, a enzima que hidrolisa a ligação difosfato do ATP.

EC 3.7 – Atuam em ligações C-C

EC 3.8 – Hidrolisam haletos orgânicos

EC 3.9 – Atuam sobre ligações P-N

EC 3.10 – Hidrolisam ligações S-N.

EC 3.11 – Atuam em ligações C-P

EC 3.12 – Atuam em ligações S-S.

EC 3.13 – Hidrolisam ligações C-S.

### **3.3 Aplicação industrial das hidrolases microbianas**

Atualmente, dentre as principais hidrolases microbianas com aplicação industrial podem-se citar as amilases, proteases, lipases e esterases (KONCEPT ANALYTICS, 2010) e, devido à crescente demanda por tecnologias eco-amigáveis na indústria de papel e têxteis naturais, as pectinases (AHLAWAT et al., 2007, 2008, 2009).

#### **3.3.1 Pectinases**

São um grupo de enzimas que degradam substâncias pécticas, macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular. Quimicamente, as pectinas são um complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, composto de resíduos de ácido galacturônico, unidos por ligações  $\alpha$ -1,4, e parcialmente esterificados por grupos metiléster e parcial ou completamente neutralizados por íons sódio e potássio (GUMMADI; PANDA, 2003; UENOJO; PASTORE, 2007).

Existem basicamente três tipos de pectinases (Figura 5): a pectina esterase (hidrolase desesterificante), que remove os grupos metiléster, liberando metanol; as despolimerizantes hidrolíticas (poligalacturonases) e as liases despolimerizantes (pectina e pectato liases), que catalisam o rompimento das ligações glicosídicas por trans-eliminação (UENOJO; PASTORE, 2007).

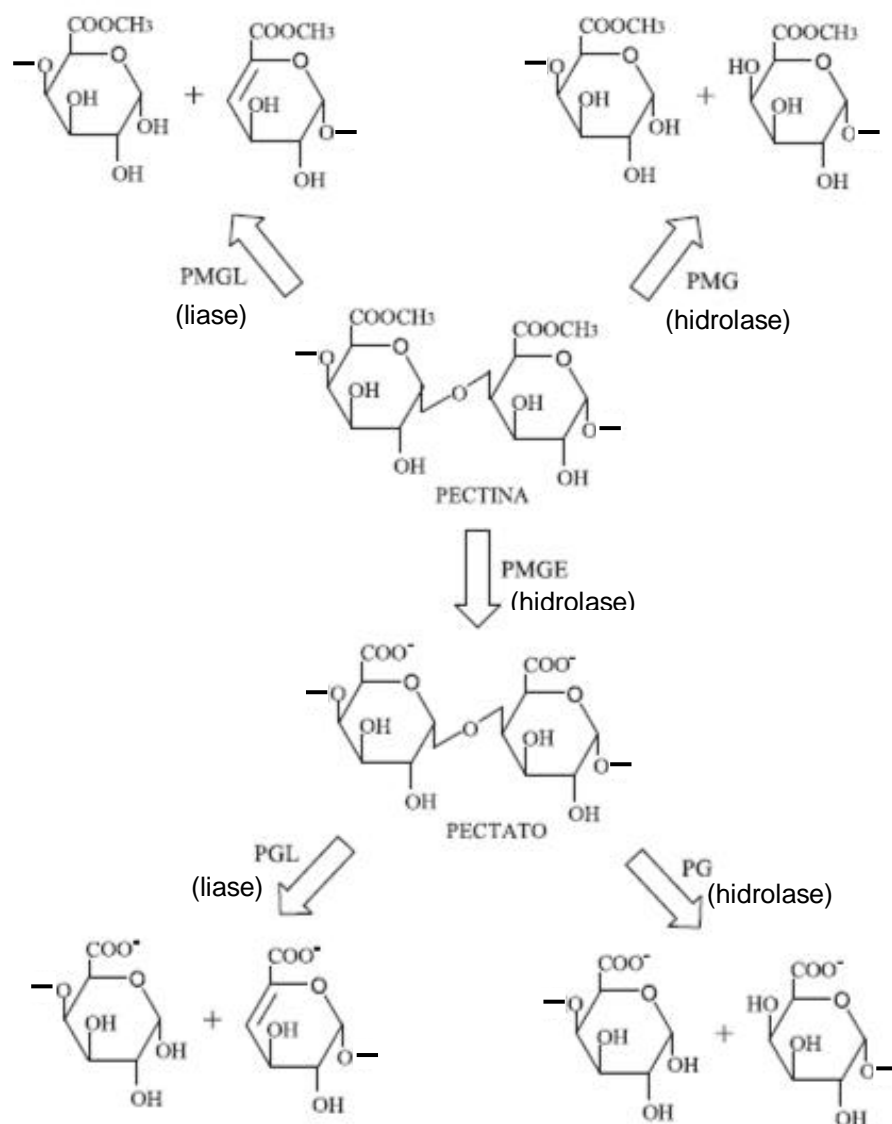


Figura 5. Modo de ação das pectinases sobre a molécula de pectina. PMGL: Polimetilgalacturonato liase. PMG: Polimetilgalacturonase. PMGE: Polimetilgalacturonato esterase (pectina esterase). PGL: Poligalacturonato liase (pectato liase). PG: Poligalacturonase (Adaptado de UENOJO; PASTORE, 2007).

As enzimas pectinolíticas são muito utilizadas na indústria de alimentos. Na produção de sucos de frutas, como o de maçã, em que a presença de pectina aumenta a turvação e a viscosidade do suco, dificultando a filtração e a concentração, o tratamento com enzimas pectinolíticas aumenta o rendimento da extração. Além disso, facilita a remoção por filtração ou centrifugação das partículas em suspensão, devido à eliminação do coloide de pectina, o que resulta num suco de aparência cristalina. Na indústria do vinho, as pectinases são utilizadas para

melhorar a extração do suco, reduzir o tempo de clarificação e melhorar a extração de pigmentos, resultando no aumento da qualidade e estabilidade do vinho (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; UENOJO; PASTORE, 2007).

Pectinases podem ser utilizadas para a fabricação de prébióticos, tais como os oligogalacturonídeos e seus subprodutos. Estes não são digeríveis, isto é, não são hidrolisados na parte superior do trato gastrointestinal, e estimulam seletivamente o crescimento e/ou a atividade de espécies bacterianas residentes no colo intestinal (BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006).

A degradação da parede celular vegetal por enzimas pectinolíticas permite a extração de óleos vegetais por processo aquoso, devido à liquefação dos componentes das paredes celulares que compõem as sementes. Porém, preparações comerciais de pectinases com alta atividade de pectina liase e baixa atividade de pectina metilesterase são preferidas por minimizarem a liberação de metanol (UENOJO; PASTORE, 2007).

Na indústria têxtil, pectinases, em conjunto com amilases, lipases e hemicelulases, têm sido utilizadas para o tratamento dos fios de algodão de uma forma suave e ecologicamente amigável, substituindo a soda cáustica anteriormente utilizada. Pectinases, juntamente com xilanases, são utilizadas na degomagem de fibras de rami, para serem utilizadas na fabricação de tecidos (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

Em pesquisas na área agrônômica, as pectinases alcalinas e celulases são utilizadas na extração de partículas virais que se encontram restritas ao floema. Os vírus são assim liberados dos tecidos, produzindo preparações muito puras dessas partículas (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

No tratamento de efluentes, as pectinases degradam o material péctico, facilitando a decomposição pelo lodo ativado (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

### 3.3.2 Amilases

O amido é um polissacarídeo composto por dois tipos de cadeias de alto peso molecular, a amilose e a amilopectina. A amilose é composta por cadeias lineares de resíduos de glicose unidos por ligações  $\alpha$ -1,4. Devido à sua estrutura, é facilmente degradada pela  $\alpha$ -amilase. A amilopectina (Figura 6) representa 75 a 85 % do conteúdo da maioria dos amidos. Possui cadeias lineares de resíduos de glicose com ligações  $\alpha$ -1,4 e ramificações na cadeia linear com ligações  $\alpha$ -1,6. As ramificações por sua vez são constituídas de cadeias lineares com ligações  $\alpha$ -1,4 (AIYER, 2005).

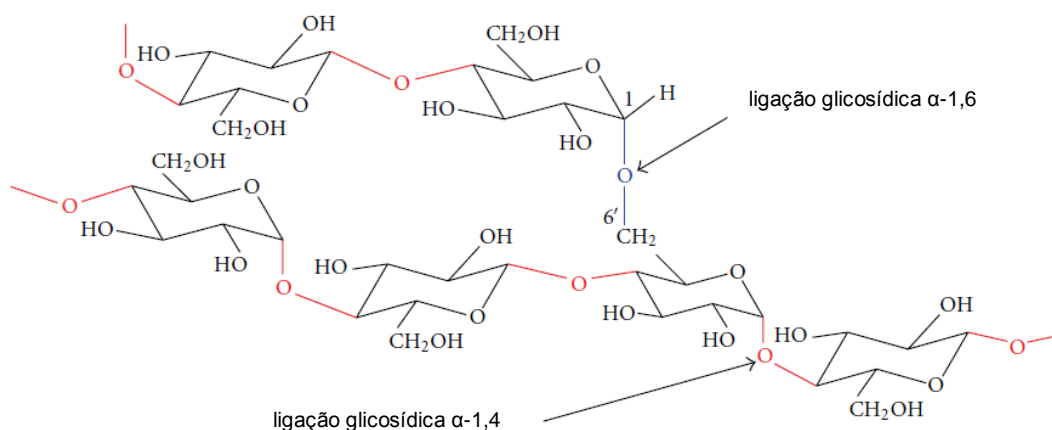


Figura 6. Estrutura dos resíduos de glicose na molécula de amilopectina: ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 nas cadeias lineares e ligações  $\alpha$ -1,6 no local das ramificações (Hill et al., 2012).

Entre as enzimas amilolíticas produzidas por fungos encontram-se a  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e a amiloglicosidade. Alfa-amilases são endo-amilases, que hidrolisam ligações  $\alpha$ -1,4 no interior da molécula, e transformam o amido em dextrinas e oligossacarídeos. A  $\beta$ -amilase atua a partir da ponta não redutora das cadeias lineares e hidrolisa a penúltima ligação glicosídica da cadeia, liberando maltose. A amiloglicosidase ou glucoamilase é uma exo-amilase que hidrolisa resíduos de glicose terminais escalonadamente desde o extremo das cadeias  $\alpha$ -1,4 glucano presentes nas dextrinas (AIYER, 2005; ADENIRAN; ABIOSE; OGUNSUA,

2010). Alguns fungos também produzem enzimas desramificantes que hidrolisam as ligações  $\alpha$ -1,6, produzindo maltose e glicose (KHALIKOVA; SUSI; KORPELA, 2005).

Utilizando amido de milho, as enzimas  $\alpha$ -amilase, amiloglicosidase e glicose isomerase são utilizadas sequencialmente para a produção de xarope de milho de alto conteúdo de frutose. Amilases são também utilizadas na produção de fios de algodão para a indústria têxtil, removendo o amido após o processo de fiação (AIYER, 2005).

A  $\alpha$ -amilase, juntamente com a xilanase, é importante na panificação, pois afeta diretamente a capacidade de absorção e retenção de moléculas de água pelas frações amido e hemicelulose da farinha, influenciando na manutenção da maciez e elasticidade dos produtos. O grau controlado de hidrólise causado pela enzima industrial Novamyl R sobre a amilopectina, sem hidrolisar completamente a rede da molécula, previne a recristalização da amilopectina após a gelatinização, conferindo assim elasticidade ao pão (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

Amilases alcalinas são utilizadas na preparação de detergentes para a remoção de amido em roupas e louças. Na indústria de papel, amilases são utilizadas para a remoção de amido das fibras, no estágio de remoção de tinta durante a reciclagem de papel, e no tratamento dos efluentes resultantes dessa indústria (AIYER, 2005).

A maltose, dissacarídeo de moléculas de glicose obtido pela ação da  $\beta$ -amilase, é amplamente utilizada como adoçante na indústria alimentícia, devido à sua baixa tendência de se cristalizar e por ser relativamente não higroscópica. A maltose também é utilizada em Medicina como um suplemento de açúcar de uso intravenoso. As  $\alpha$ -amilases termoestáveis de *Bacillus licheniformes* e *Bacillus amyloliquefaciens* são utilizadas para a produção de maltose. Amilases fúngicas são também utilizadas na produção de álcool a partir de amido (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002; AIYER, 2005).

### 3.3.3 Proteases

As enzimas proteolíticas são uma numerosa família de hidrolases que catalisam o rompimento de ligações peptídicas. Diversos termos diferentes são utilizados para nomeá-las, porém, segundo a nomenclatura recomendada pela IUBMB, apenas alguns são sinônimos entre si (Figura 7).

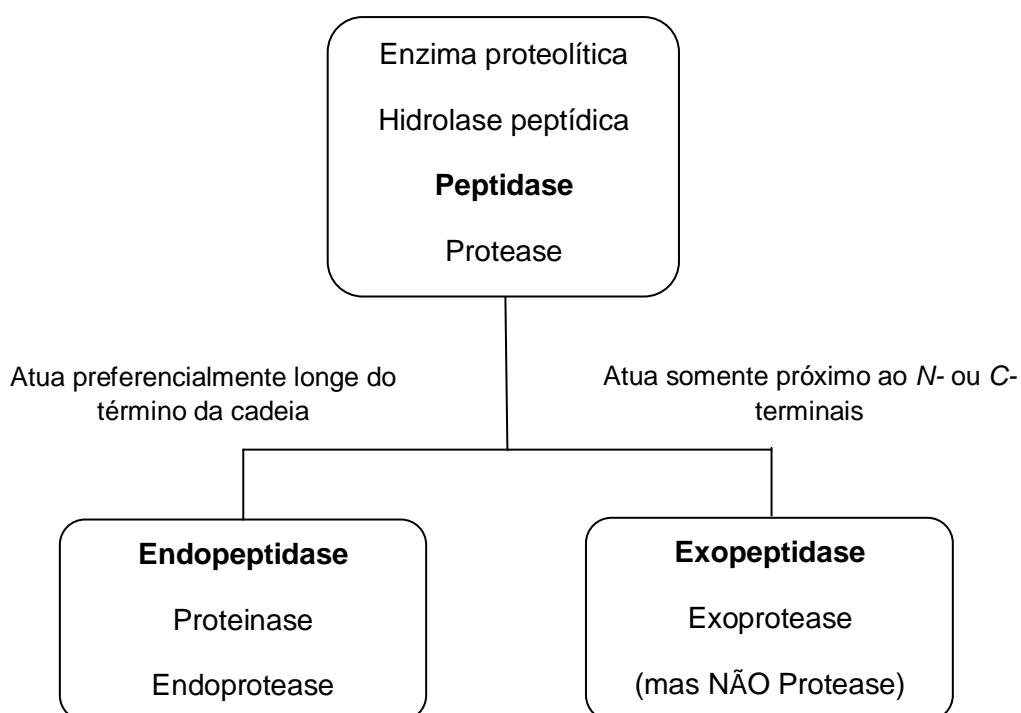


Figura 7. Termos sinônimos para alguns tipos de enzimas proteolíticas. Os termos dentro de cada quadro têm, atualmente, o mesmo significado. Os termos **peptidase**, **endopeptidase** e **exopeptidase**, em negrito, são os recomendados pelo IUBMB-International Union of Biochemistry and Molecular Biology (BARRET, 2001).

As proteases são divididas em endopeptidases ou proteinases e em exopeptidases ou exoproteases, de acordo com o local onde realizam o rompimento da cadeia peptídica. Endopeptidases atuam preferencialmente no interior da cadeia de peptídeos e proteínas, longe dos C e N terminais, produzindo peptídeos de menor extensão. Exopeptidases atuam somente sobre as pontas da cadeia nas ligações peptídicas C e N terminais, produzindo aminoácidos livres, di- ou

tripeptídeos. Aminopeptidases hidrolisam a cadeia peptídica a partir do N terminal, produzindo aminoácidos livres (BARRET, 2001, IUBMB, 2013b).

Aminopeptidases microbianas têm um papel importante na utilização de proteínas exógenas como fonte de aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas, para a geração de energia metabólica e na reciclagem de cofatores. Nas bactérias lácticas, estas enzimas estão envolvidas na utilização da caseína como fonte exógena de aminoácidos. A Aminopeptidase A de *Lactococcus lactis* não é essencial para o crescimento do microrganismo em meio contendo caseínas, mas é considerada importante no desenvolvimento de flavor em produtos lácteos (SANZ, 2007). Devido à capacidade das proteases fúngicas neutras, ativas em pH 7, de hidrolisar ligações peptídicas contendo aminoácidos hidrofóbicos, são utilizadas para suplementar a ação de proteases vegetais, animais e bacterianas na obtenção de hidrolisados proteicos de reduzido sabor amargo, os quais tem uso em formulações infantis, em produtos dietéticos e como flavorizantes (RAO et al., 1998).

Atualmente, a maior utilização das proteases é em detergentes. Para tanto, é necessário que sejam estáveis a altas temperaturas e em pH alcalino. Proteases cujo ponto isoelétrico é próximo ao pH da solução detergente são mais adequadas para essa finalidade, já que resistem melhor a faixas de pH mais elevado. Usualmente se utilizam as proteases de certas cepas de *Bacillus* sp. para essa finalidade (RAO et al., 1998).

Algumas bactérias e fungos produzem collagenases, que podem ser tanto exo- quanto endoproteases, sendo muito específicas quanto ao substrato, agindo somente sobre colágeno e gelatina (RAO et al., 1998). As collagenases, associadas a outras proteases, são utilizadas na dissociação de tecidos animais para fins de pesquisa (ROCHE, 2013; INVITROGEN, 2004).

Proteases de *Aspergillus oryzae* são utilizadas como medicamento auxiliar nas deficiências enzimáticas (RAO et al., 1998). Termolisina, uma endopeptidase produzida por *Bacillus stearothermophilus*, é bastante resistente ao calor, sendo utilizada na produção industrial de aspartame (MANSFELD, 2007).



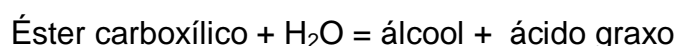
### 3.3.4 Lipases e esterases

Ambas as enzimas catalisam a hidrólise de ligações carboxil éster. A IUBMB recomenda a denominação de triacilglicerol lipase (EC 3.1.1.3) às enzimas que catalizam a reação:



Esta reação pode seguir ocorrendo até a completa hidrólise do triacilglicerol em glicerol e 3 ácidos graxos livres.

Lipases diferenciam-se de carboxil esterases (EC 3.1.1.1), as quais catalisam a reação:



A distinção entre esterases e lipases está baseada na sua especificidade de substrato e sua capacidade de hidrolisar ésteres em solução ou em emulsão, respectivamente. Considera-se que lipases hidrolisam emulsões de triacilgliceróis (TAG) de cadeia média e longa, insolúveis em água, como a trioctanoína (C8), a trioleína (C18) e o azeite de oliva (C18 e C16), apesar de também apresentarem atividade sobre emulsões e soluções dos TAG de cadeia curta pouco solúveis, como a tripropionina (C3) e a tributirina (C4). Esterases não hidrolisam emulsões de TAG de cadeia longa, mas apresentam atividade máxima sobre soluções de TAG de cadeia curta (triacetina, tripropionina, tributirina). Além disso, esterases típicas não são ativadas pela presença de uma interface, isto é, não mostram aumento abrupto na atividade quando em presença de substrato na forma agregada, como ocorre quando as concentrações de substrato estão acima do limite de solubilidade, exigindo uma emulsão (CHAHINIAN et al., 2000; Nini et al., 2001; CHAHINIAN et al., 2002; CHAHINIAN; SARDA, 2009). Resumidamente, ao contrário das esterases, as lipases exibem baixa atividade frente a substratos monoméricos. Porém, tão logo o substrato seja capaz de formar micelas ou uma fase separada, aumenta muito a atividade da lipase (SENANAYAKE; SHAHIDI, 2005).

A determinação da estrutura tridimensional de várias lipases, inclusive as microbianas, revelou que, em meio aquoso, o sítio ativo está encoberto por uma

cadeia peptídica em forma de tampa (*lid*) ou aba (*flap*) constituída de uma ou duas  $\alpha$ -hélices curtas ligadas ao corpo da lipase através de elementos estruturais flexíveis (Figura 8) (SCHMID; VERGER, 1998; FOJAN et al., 2000; CHAHINIAN et al., 2002, BROCCA et al., 2003).

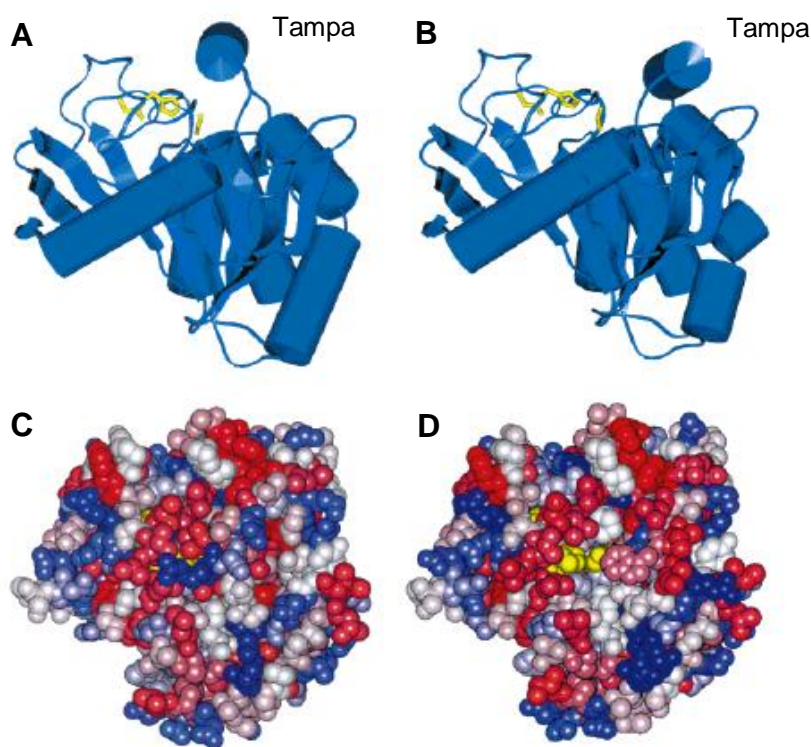


Figura 8. Estrutura da lipase de *Mucor miehei* na conformação fechada (A, C) e aberta (B, D). A e B (vista lateral): a tríade catalítica (amarelo) e os elementos da estrutura secundária. C e D (vista superior): modelo colorido de acordo com o decréscimo da polaridade (azul escuro – azul claro – branco – vermelho claro – vermelho escuro). Quando a tampa se abre, o sítio catalítico (amarelo) torna-se acessível (SCHMID; VERGER, 1998).

Esta tampa é uma estrutura anfipática, que na conformação fechada apresenta o lado hidrofílico em contato com o solvente aquoso, enquanto o lado hidrofóbico está dirigido ao centro da molécula, ocluindo o sítio ativo. Quando em presença de uma interface lipídio-água, a tampa muda para a conformação aberta, a face hidrofóbica fica exposta e contribui uma maior hidrofobicidade na região de ligação do substrato. Por isso, não somente a natureza anfipática da tampa, mas também a sequência específica de aminoácidos, a localização topológica, o comprimento e a complexidade envolvida no movimento da tampa pode ter importância na atividade e especificidade das lipases (SCHMID; VERGER, 1998;

FOJAN et al., 2000; CHAHINIAN et al., 2002, BROCCA et al., 2003). O sítio ativo está localizado dentro de um bolsão, cuja borda hidrofóbica interage com a interface do substrato hidrofóbico. A profundidade, forma e características físico-químicas do bolsão variam conforme a lipase. A especificidade quanto ao substrato é decorrente da morfologia do sítio de ligação da acila: ele é alongado, hidrofóbico, localizado numa fissura da parede do bolsão. Investigações por difração de raio-X da estrutura das lipases mostraram que elas contêm uma dobra  $\alpha,\beta$ , consistindo de uma folha  $\beta$  central e hidrofóbica situada entre duas  $\alpha$ -hélices anfífilas. Sobre a dobra  $\alpha,\beta$  encontra-se o sítio de ligação (PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998).

A ação das lipases sobre as ligações carboxiléster pode ocorrer tanto em meio aquoso, com a formação de ácido e álcool devido à hidrólise do éster, quanto em meio não aquoso, ocorrendo a síntese de ésteres SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). A Figura 9 apresenta o mecanismo de ação das lipases.

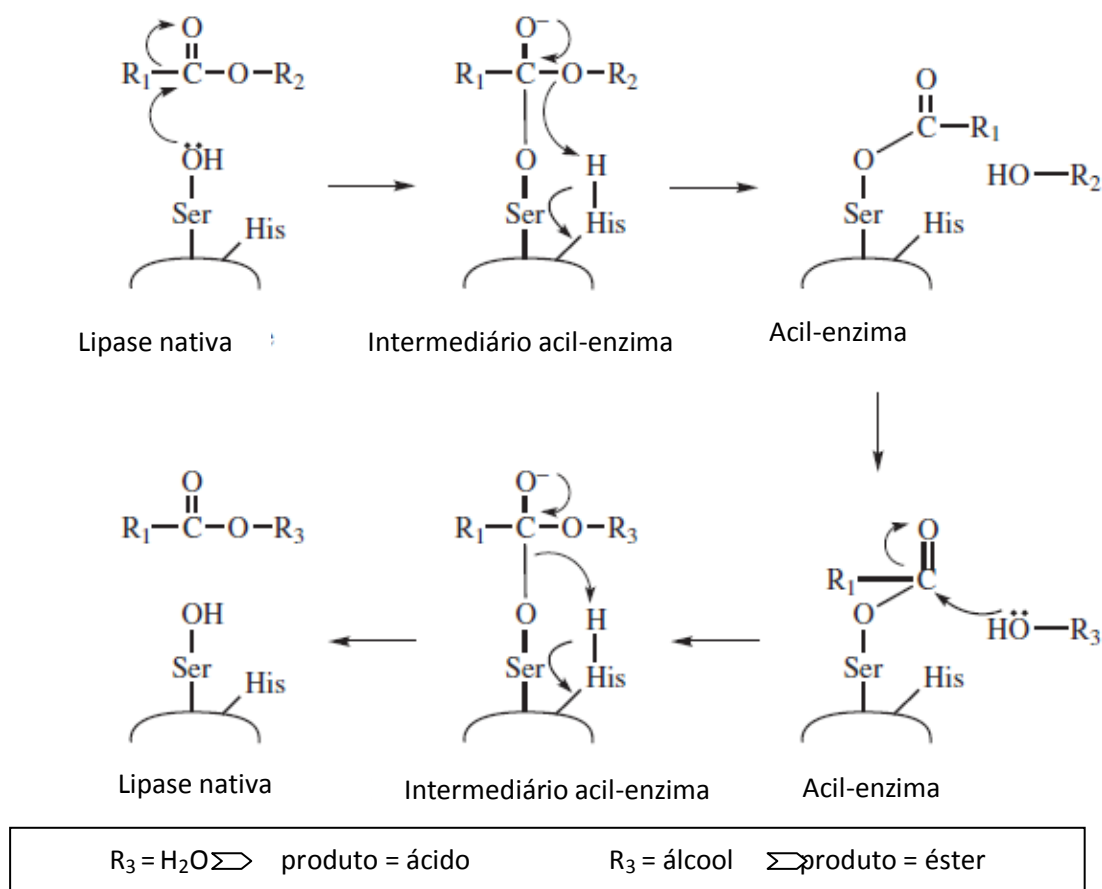


Figura 9. Mecanismo de ação de uma lipase na hidrólise ou na síntese de ésteres carboxílicos (SENANAYAKE; SHAHIDI, 2005).

O substrato se liga ao sítio ativo e o carbono da carboxila é posicionado próximo ao oxigênio da hidroxila da cadeia lateral da serina. Esse oxigênio faz um ataque nucleofílico ao carbono da carbonila do substrato e forma-se um estado tetraédrico de transição, a acil-enzima intermediária. A serina torna-se um nucleofílico mais potente pela proximidade dos resíduos vizinhos histidina e ácido aspártico. O hidrogênio da hidroxila da serina é transferido temporariamente para o resíduo histidina, que se situa próximo. A acil-enzima intermediária se rearranja e o hidrogênio da histidina é transferido para a metade álcool do substrato éster, formando assim um álcool, que então abandona o sítio ativo. A metade acil-graxo está agora covalentemente ligada à enzima por um enlace éster, a acil-enzima. No passo seguinte, ocorre a reversão da acilação da lipase e a acil-enzima é atacada por um álcool ou uma molécula de água, formando-se uma nova acil-enzima intermediária, que se rearranja, liberando um novo éster ou ácido, respectivamente (SENANAYAKE; SHAHIDI, 2005).

Lipases apresentam diversas conformações de sítio ativo (PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998), o que lhes permite atuar sobre uma ampla variedade de substratos e apresentar régio e enantiosseletividade, tanto na hidrólise quanto na síntese (COSTA; AMORIN, 1999; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Em consequência, têm extensa aplicação industrial: em alimentos, detergentes, indústria de couro, cosméticos, papel e farmacêutica.

A maior aplicação das lipases é em detergentes para lavanderia e limpeza de louças, campo que absorveu aproximadamente 32 % das vendas dessas enzimas. Estimou-se que cerca de 1.000 toneladas de lipases são adicionadas aos 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos anualmente (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Porém, outras aplicações são igualmente importantes e vêm se destacando. Lipases catalisam a transesterificação de óleos e gorduras, isto é, a modificação na composição dos ácidos graxos, transformando matérias primas de menor valor em produtos com melhores propriedades nutricionais ou funcionais (OSBORN; AKOH, 2002). Substitutos de manteiga de cacau, o substituto de gordura de leite humano “Betapol” e lipídios de baixo teor de calorias ricos em ácidos graxos poliinsaturados são exemplos desses produtos (SHAHIDI; SENANAYAKE, 2009). Devido à sua

capacidade de transesterificação, lipases são utilizadas na produção de biodiesel. Lipases também podem ser utilizadas na síntese de 1-butil oleato, utilizado para diminuir a viscosidade do biodiesel no inverno (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Na indústria alimentícia, lipases fúngicas de *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus oryzae* e *A. niger* são utilizadas no desenvolvimento de aromas e aceleração do amadurecimento de queijos, na produção de similares de queijo e na lipólise de creme. Em cosméticos, a lipase de *R. miehei* é utilizada na síntese de isopropilmiristato, isopropilpalmitato e 2-etilhexilpalmitato, emolientes para produtos como protetores solar, óleos de banho e cremes para a pele. São também utilizadas em preparações farmacêuticas como auxiliares digestivos. Lipases fúngicas também têm sido utilizadas como biossensores em instrumentos de diagnóstico clínico (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Na indústria de couros, promovem a eliminação de gordura das peles sem a utilização de produtos químicos agressivos ao meio ambiente. São utilizadas na indústria têxtil para a remoção dos lubrificantes utilizados na fabricação do fio, o que melhora sua posterior absorção de água, uniformizando o processo de tintura. Essas enzimas também têm uso na química fina devido à sua capacidade de dessimetriação de misturas racêmicas e síntese de compostos quirais intermediários de moléculas com ação farmacológica. A mistura racêmica resultante da síntese de baclofeno, um relaxante muscular, é resolvida por lipase de *Candida cylindracea* (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

#### **4 Purificação de enzimas**

Proteínas e enzimas constituem uma classe importante de produtos biofarmacêuticos, que também encontram aplicação na indústria alimentícia e biotecnológica. Nos últimos anos, os avanços na engenharia genética permitem a produção em larga escala, através de biocultivo, de praticamente qualquer proteína em concentrações cada vez crescentes. Desta forma, o entrave no desenvolvimento de processos biotecnológicos, anteriormente situado na produção, foi deslocado

para a purificação dos produtos proteicos a partir dos materiais biológicos brutos (NFOR et al., 2008; RITO-PALOMARES, 2008). A eliminação desse gargalo é amplamente reconhecida como tecnicamente e economicamente desafiadora, pois a purificação é responsável por uma parte considerável dos custos totais de produção. Além disso, a indústria biotecnológica tem sido pressionada a desenvolver mais rapidamente produtos de melhor qualidade, maior segurança e de menor custo.

A necessidade de purificar uma enzima de forma eficiente, econômica, em suficiente pureza e quantidade se aplica a qualquer processo de purificação em larga escala. A extensão da purificação depende do uso final do produto proteico. Assim, do ponto de vista das necessidades para o processamento *downstream*, é importante saber a aplicação da proteína de interesse. Como exemplo, proteínas terapêuticas destinadas à administração injetável têm os mais rígidos requisitos de pureza, os quais estão acima de 99%.

Os principais aspectos que tornam a purificação da proteína/enzima de interesse tecnicamente desafiadora incluem (NFOR et al., 2008):

- i. Baixa concentração inicial do produto na solução;
- ii. Mistura complexa em solução, contendo grande número de contaminantes, alguns com características muito semelhantes ao produto;
- iii. Presença de contaminantes críticos, os quais devem ser removidos, podendo permanecer os não críticos;
- iv. Deficiente caracterização da solução bruta inicial, sendo pouco conhecidas as propriedades fisicoquímicas de seus componentes (p. ex., peso molecular, carga, hidrofobicidade), bem como as propriedades termodinâmicas (p. ex., solubilidade) e de escoamento (p. ex., viscosidade, difusividade);
- v. Estabilidade do produto, devido a que muitas proteínas são termolábeis e sensíveis a pH extremos e a produtos químicos, como surfactantes e solventes orgânicos;
- vi. Requerimentos bem estritos quanto à pureza, atividade biológica e quantidade do produto.

A bioseparação, ou processo de *downstream*, pode ser definida como um conjunto sequencial de operações unitárias, que, num bioprocessamento, resultam na

recuperação e purificação de produtos biológicos, nos quais se incluem proteínas, enzimas, vacinas, anticorpos. (RITO-PALOMARES, 2008). Portanto, para desenvolver um processo econômico de purificação de proteína, devem ser escolhidas as operações unitárias mais adequadas para cada etapa do processamento e interconectadas em um ou mais processos integrados, de tal forma que permitam uma suficiente purificação ao mínimo custo.

A Tabela 2 apresenta os objetivos das etapas de purificação.

Tabela 2. Objetivos das etapas de purificação.

Etapa da purificação	Objetivos
Captura	Isolamento, concentração, redução de volume
Purificação intermediária	Remoção das impurezas em maior quantidade ou das principais proteínas contaminantes
Purificação fina	Remoção de impurezas traço, contaminantes estreitamente relacionados e agregados proteicos

(NFOR et al., 2008)

Devido ao alto poder de resolução das operações cromatográficas, são geralmente empregadas em uma combinação sequencial de várias delas, apesar de apresentarem baixa produtividade (NFOR et al., 2008). As técnicas de cromatografia líquida mais comumente utilizadas são a cromatografia de troca iônica, um fracionamento baseado na carga elétrica das moléculas, e a cromatografia baseada nas interações hidrofóbicas entre a proteína e a fase estacionária (ANSEJO; ANDREWS, 2008). No entanto, outras operações unitárias de melhor produtividade têm sido propostas, como extração em sistema aquoso bifásico (ex.: água+Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/polietilenoglicol), em sistema trifásico (ex.: água+(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/tert-butanol), separação em membrana por filtração tangencial de alta performance, entre outras, especialmente para produtos cujos requisitos de pureza são menos restritos (p. ex.: produtos alimentícios e aplicações industriais) (PRZYBYCIEN; PUJA; STEELE, 2004).

A partir do advento da moderna cromatografia líquida, é raro que qualquer das antigas técnicas de separação, como a precipitação, a filtração e a cristalização, sejam utilizadas isoladamente. Hoje em dia, geralmente se utiliza uma combinação de técnicas que assegurem a quantidade, qualidade e pureza desejada da proteína alvo. Uma análise de 95 artigos publicados entre 1980 e 2000 sobre purificação de lipases microbianas (SAXENA et al., 2003) mostrou que a maioria das lipases é extracelular e que na pré-purificação geralmente são utilizadas a filtração ou a centrifugação para a remoção das células. O caldo é então concentrado por ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio ou extração com etanol ou acetona. Em torno de 80% dos esquemas de purificação utilizaram a precipitação, 60 % com sulfato de amônio e 35 % com etanol. Em comparação com outras técnicas, que obtiveram rendimento de 60-70 %, os métodos de precipitação obtiveram um rendimento médio de 87 %. A precipitação foi geralmente utilizada como uma etapa bastante grosseira de separação, seguida por uma combinação de vários métodos cromatográficos.

A cromatografia de troca iônica é a mais comum, utilizada em 67 % dos esquemas de purificação analisados e em 29 % deles é utilizada mais de uma vez. As matrizes trocadoras de ânions foram as mais utilizadas (58 %). O segundo método mais frequente foi a filtração em gel, utilizada em 60 % dos esquemas de purificação e mais de uma vez em 22 % deles. A cromatografia de interação hidrofóbica foi utilizada em 18 % dos casos. Utilizando-se métodos de afinidade, entre eles o de interação hidrofóbica, o fator de purificação atingido variou de 2 a 10 (SAXENA et al., 2003).

#### **4.1 Métodos de purificação**

Atualmente, os principais métodos de purificação de proteínas para processamento em larga escala são a precipitação, a ultrafiltração e os métodos de cromatografia líquida.



#### 4.1.1 Precipitação

Vários métodos de precipitação são utilizados hoje em dia. A precipitação com um sal neutro, como sulfato de amônio, é útil na purificação e enriquecimento da proteína alvo a partir do extrato bruto, sem que a mesma perca sua atividade. As bases físico-químicas do fracionamento utilizando sais residem nas diferenças de solubilidade das proteínas quando em presença de elevadas concentrações de sais. O sal remove a água de hidratação das moléculas proteicas, reduzindo assim sua solubilidade. Os precipitados proteicos mantêm sua conformação nativa e podem ser dissolvidos novamente. Fatores como pH, temperatura e pureza da fração proteica influenciam o ponto de *salting-out* de uma proteína em particular (PERALTA, 2003).

Na precipitação com solventes orgânicos neutros miscíveis com água, geralmente etanol ou acetona, ocorre a redução da solubilidade da maioria das proteínas globulares devido ao decréscimo da constante dielétrica da mistura aquosa, pois etanol e acetona apresentam momento dipolo menor que a água. Desta forma aumentam as forças de atração entre cargas opostas, as moléculas proteicas tendem a se agrupar e precipitam (PERALTA, 2003). Em escala industrial ainda se utiliza o fracionamento/purificação com etanol gelado na produção de albumina sérica humana, imunoglobulinas e outros produtos derivados de sangue (método de Cohn). Porém, os métodos cromatográficos líquidos, em combinação com ultrafiltração, têm substituído o método do etanol, proporcionando maior pureza e rendimento e são mais facilmente automatizáveis (TANAKA et al., 1998, PERALTA, 2003).

#### 4.1.2 Ultrafiltração

A ultrafiltração é um método de fracionamento e concentração em que uma solução proteica complexa é forçada à alta pressão contra uma membrana semipermeável. Os poros da membrana permitem a passagem de água, sais, compostos orgânicos e moléculas proteicas de tamanho menor que o diâmetro

médio dos poros. As moléculas proteicas maiores são retidas pela membrana, formando uma solução mais concentrada que a solução original. É um método menos discriminativo que a cromatografia de exclusão molecular, pois fornece apenas duas frações: “proteínas maiores” e “proteínas menores”. Sua grande vantagem é concentrar de forma suave soluções proteicas muito diluídas com um mínimo de desnaturação e apresentar recuperação acima de 90 %, permitindo o processamento posterior do material concentrado com métodos mais eficientes de fracionamento (PERALTA, 2003).

#### **4.1.3 Cromatografia líquida**

Hoje em dia, os métodos cromatográficos são os mais frequentemente utilizados na purificação de proteínas, geralmente empregando-se mais de um deles em associação. A escolha e a sequência dos métodos dependem de fatores como a pureza a ser alcançada, o custo da matriz, a quantidade de material a processar, entre outros. Os métodos cromatográficos mais comumente utilizados são a gel filtração, a troca iônica e a interação hidrofóbica. A Tabela 3 apresenta vantagens e desvantagens de cada método, apresentados em mais detalhes nas seções a seguir.

Tabela 3. Vantagens e desvantagens de alguns processos de cromatografia líquida para a purificação de proteínas.

Método cromatográfico	Vantagens	Desvantagens
Exclusão molecular ou gel filtração	Alto limite de exclusão	Difícil ajuste fino devido ao limite de exclusão
	Formato dos poros ideal para separação de proteínas globulares	Resolução depende do volume de amostra; soluções diluídas são difíceis de purificar
	Fácil operação	Matrizes caras
	Útil na dessalinização da amostra	Aumento de escala não é simples
Troca iônica	Fácil operação	Alta concentração de sal na amostra compete com a proteína pelos sítios de ligação
	Grande resolução	
	Fácil aumento de escala	
	Matrizes relativamente baratas	
Interação hidrofóbica	Gel resiste a vários ciclos operacionais	Matriz mais cara que a de troca iônica
	Método econômico em escala industrial	Ocasionalmente:
	Purificação igual ou mais elevada que troca iônica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Difícil regeneração</li> <li>• Baixa recuperação da proteína</li> <li>• Desnaturação irreversível da proteína</li> </ul>
	Automatizável	
	Fácil execução	
	Rápida	
	Recomendado para lipases (caráter hidrofóbico da molécula enzimática)	
	Pode ser usada no estágio inicial da purificação	

Adaptado de JACOB, 1999; GE Healthcare Life Sciences/Products 2006, 2010ab; PERALTA, 2003; GUPTA; GUPTA; RATI, 2004.

#### 4.1.3.1 Filtração em gel ou exclusão molecular

Este método de fracionamento permite a separação de moléculas com base nas diferenças de seus tamanhos e formas. A matriz é um material polimérico inerte, apresentando um grau determinado de porosidade interna. Os poros, bem como os espaços entre as esferas do gel foram previamente preenchidos com o eluente de trabalho. Nas colunas, as proteínas de diferentes tamanhos moleculares são separadas conforme o percurso percorrido. Proteínas de tamanho menor que os poros penetram em seu interior e têm sua eluição retardada. Proteínas maiores não são retidas e eluem rapidamente. Diferente da cromatografia de troca iônica e de interação hidrofóbica, não há interação entre as moléculas proteicas e a matriz. O principal uso da filtração em gel é o fracionamento proteico. Se a proteína de interesse é relativamente grande, por ex. de peso molecular acima de 100 kDa, a filtração em gel pode ser utilizada nas etapas iniciais de purificação. A proteína elui nas primeiras frações e todas as proteínas menores permanecem na coluna, permitindo considerável purificação. Frequentemente se utiliza em associação com a cromatografia de troca iônica, visto que os dois métodos são complementares (PERALTA, 2003; GE Healthcare Life Sciences/gel filtration, 2010a).

#### 4.1.3.2 Troca iônica

A cromatografia de troca iônica está baseada na interação reversível entre uma proteína carregada eletrostaticamente e uma matriz cromatográfica de carga oposta. A carga superficial líquida de uma molécula varia de acordo com o pH do meio. Quando o pH está acima de seu ponto isoelétrico ( $pI$ ), a superfície proteica apresenta excesso de cargas negativas e se ligará às cargas positivas da matriz trocadora de ânions. Abaixo de seu  $pI$ , a proteína se ligará a uma matriz trocadora de cátions negativamente carregada. As proteínas, em tampão de baixa força iônica, se ligam à matriz durante sua adição à coluna. As condições da coluna são então alteradas de forma a promover a eluição diferenciada dos compostos ligados à matriz, obtida geralmente pelo aumento da concentração salina ou mudança de pH

do eluente, escalonadamente ou em gradiente. O sal mais comumente utilizado é NaCl. Os íons da solução salina competem com as cargas da superfície proteica pelos radicais carregados da superfície da matriz, desalojando a proteína e ocasionando sua eluição na coluna. Na alteração do pH, as cargas superficiais de cada proteína presente se alteram de forma diferenciada e a interação com a matriz cessa em diferentes pH, causando assim a eluição gradativa das mais fracamente às mais fortemente adsorvidas. Desta forma, mesmo biomoléculas que apresentam pequenas diferenças de carga superficial líquida conseguem ser separadas. A popularidade deste método deve-se à sua alta resolução, facilidade de uso, reprodutibilidade e baixo custo (PERALTA, 2003; GE Healthcare Life Sciences, 2010b).

#### **4.1.3.3 Interação hidrofóbica**

Neste tipo de cromatografia líquida em coluna, as proteínas são separadas de acordo com as diferentes hidrofobicidades superficiais que apresentam, utilizando-se a interação reversível destas proteínas com a superfície hidrofóbica da matriz. A matriz é composta de material inerte ao qual foram adicionados ligantes hidrofóbicos, geralmente octila ou fenila. Hidrofobicidade pode ser definida como a repulsão entre um composto não polar e um ambiente polar, p. ex. água. Quando um único composto hidrofóbico é colocado na água, ele força as moléculas de água que o circundam a formarem uma estrutura ordenada semelhante a uma cápsula, um clatrato. Esta condição é termodinamicamente desfavorável, diminuindo a entropia. Quando dois ou mais compostos não polares são colocados na água, eles se agregam espontaneamente, devido às interações hidrofóbicas entre eles. As interações hidrofóbicas são energeticamente favoráveis devido ao ganho de entropia, isto é, há um aumento na desordem quando menos sítios hidrofóbicos ficam expostos ao ambiente polar (KENNEDY, 1990; GE Healthcare Life Sciences, 2006).

A interação hidrofóbica não é uma ligação de grupos hidrofóbicos entre si, nem são forças de atração como tal. Interações hidrofóbicas são forçadas sobre os

compostos não polares pelo ambiente polar. É a estrutura da água que cria as interações hidrofóbicas. Assim, qualquer alteração na estrutura da água pela adição de sais ou solventes orgânicos afeta as interações. De forma geral, aumentando a força iônica ocorre aumento da hidrofobicidade. Porém, há ânions, p. ex.  $\text{ClO}_4^-$  e  $\text{I}^-$ , e cátions, p. ex.  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Ba}^{+2}$ , caotrópicos, isto é, rompem a estrutura da água e, assim, tendem a diminuir as interações hidrofóbicas. Sais anticaotrópicos, como  $\text{NaCl}$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , tendem a favorecê-las (KENNEDY, 1990).

A mistura de proteínas, dissolvida em tampão de alta força iônica, é adicionada à fase estacionária, interagindo com os ligantes hidrofóbicos. A eluição é realizada através de um gradiente salino decrescente. As proteínas menos hidrofóbicas eluem nas primeiras frações e as mais hidrofóbicas exigem tampão de força iônica menor para desorverem (KENNEDY, 1990; GE Healthcare Life Sciences, 2006).

## 4.2 Fracionamento com espuma

O recente desenvolvimento de tecnologias para a produção em larga escala de proteínas recombinantes têm estimulado novas pesquisas na área de processamento pós-produção. As técnicas de purificação atualmente em uso, baseadas em métodos cromatográficos utilizados de forma sequencial, são caras, tornando-se necessário desenvolver métodos mais econômicos. Dentre as diversas etapas do processo *downstream*, a separação e a purificação têm recebido maior atenção com o objetivo de reduzir esses custos. A substituição de ao menos uma operação cromatográfica por outra operação simples, baixo custo e eficiente tem o potencial de reduzir consideravelmente o custo de produção de proteínas e enzimas (LOCKWOOD; BUMMER; JAY, 1997).

Assim, existe uma clara demanda por alternativas eficientes de purificação que apresentem suficiente seletividade, máxima recuperação, enriquecimento adequado e alta preservação da atividade catalítica, acompanhadas de custos aceitáveis e mínimo gasto de tempo. O fracionamento preparativo com espuma parece ser uma opção promissora. O método se distingue por apresentar rapidez e

condições brandas de operação, baixos custos de investimento e de consumo de energia, ausência de solventes orgânicos e equipamentos de construção simples. Acima de tudo, o modo de operação ambientalmente amigável torna o fracionamento preparativo com espuma compatível na integração com bioprocessos industriais (BURAPATANA et al., 2005; LINKE; BERGER, 2011; BURGHOFF, 2012).

Em 1918 foi concedida a primeira patente sobre fracionamento com espuma a Ostwald, na Alemanha. Em 1936, Ostwald e Siehr já o haviam aperfeiçoado a um estágio próximo ao que é comumente utilizado hoje. Em 1940, Ostwald e Mischke o utilizaram na separação de proteínas a partir de caldos de cultivo de leveduras. Nos anos 1960 e 1970, o fracionamento com espuma foi considerado como promissor para a remoção de detergentes e íons metálicos de, p. ex., águas residuais. Uma aplicação atualmente em uso é a separação de contaminantes proteicos da água em criatórios de peixes (KOI WATER GARDEN, 2013).

O fracionamento com espuma pertence a um grupo de métodos chamado técnicas de separação por adsorção em bolha. Esses métodos são baseados na adsorção seletiva de material na superfície das bolhas de gás que passam através de uma solução ou de uma suspensão (PERRY; CHILTON, 1973). Uma classificação desses métodos é apresentada na Figura 10.

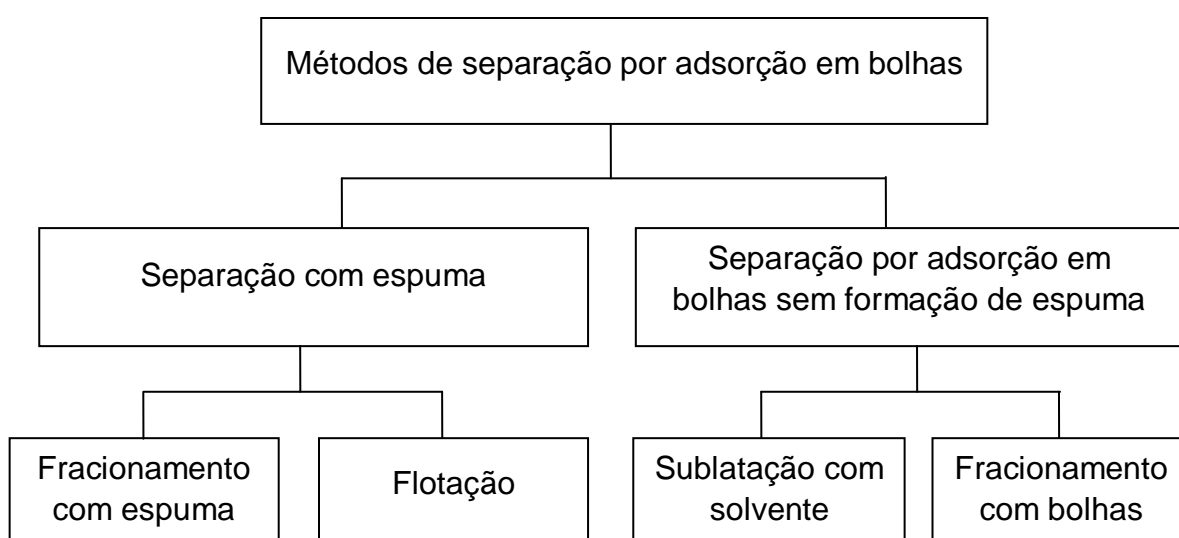


Figura 10. Métodos de separação por adsorção em bolhas (PERRY; CHILTON, 1973).

Na sublatação e no fracionamento com bolhas, não há formação de espuma. O material a ser separado adsorve na superfície das bolhas que ascendem na coluna de líquido. Quando atingem o topo da coluna, as bolhas se rompem, liberando o material que assim pode ser recuperado. Esses dois métodos se diferenciam pela presença, na sublatação com solvente, de uma camada de líquido imiscível no topo da coluna que tem a finalidade de reter o material adsorvido nas bolhas. Na flotação, o material a ser recuperado está na forma particulada e a espuma no topo da coluna torna-se enriquecida de partículas, sendo então retirada do sistema (PERRY; CHILTON, 1973).

O método do fracionamento com espuma está baseado na adsorção de compostos com atividade tensioativa na interface das bolhas de uma dispersão água-líquido. A dispersão é gerada durante a passagem de um gás através da solução que contém as moléculas alvo tensioativas (LINKE; BERGER, 2011). A Figura 11 apresenta um aparato de fracionamento.

O gás (ar, CO<sub>2</sub>, gás inerte) é injetado no fundo da coluna, que contém um determinado volume de solução de alimentação, através de um borbulhador poroso de vidro sinterizado, gerando bolhas individuais. Enquanto as bolhas ascendem na coluna do líquido, as espécies tensioativas adsorvem na interface gás-líquido, tornando-a enriquecida naquelas moléculas que apresentam maior velocidade e grau de adsorção. As bolhas deixam a coluna de líquido, carregando consigo soluto adsorvido e líquido de alimentação no interstício entre as bolhas, formando a coluna ascendente de espuma. A espuma se forma somente quando os filmes que recobrem as bolhas são suficientemente estáveis, permitindo que as bolhas formadas se acumulem no topo da coluna de líquido. O líquido intersticial na coluna de espuma drena lentamente entre as lamelas das bolhas, arrastando consigo o soluto que não foi adsorvido, e retorna ao líquido de alimentação. A drenagem torna as lamelas mais delgadas, promovendo a desproporção (“disproportionation” ou “Ostwald ripening”) e a coalescência entre as bolhas (LOCKWOOD; BUMMER; JAY, 1997).



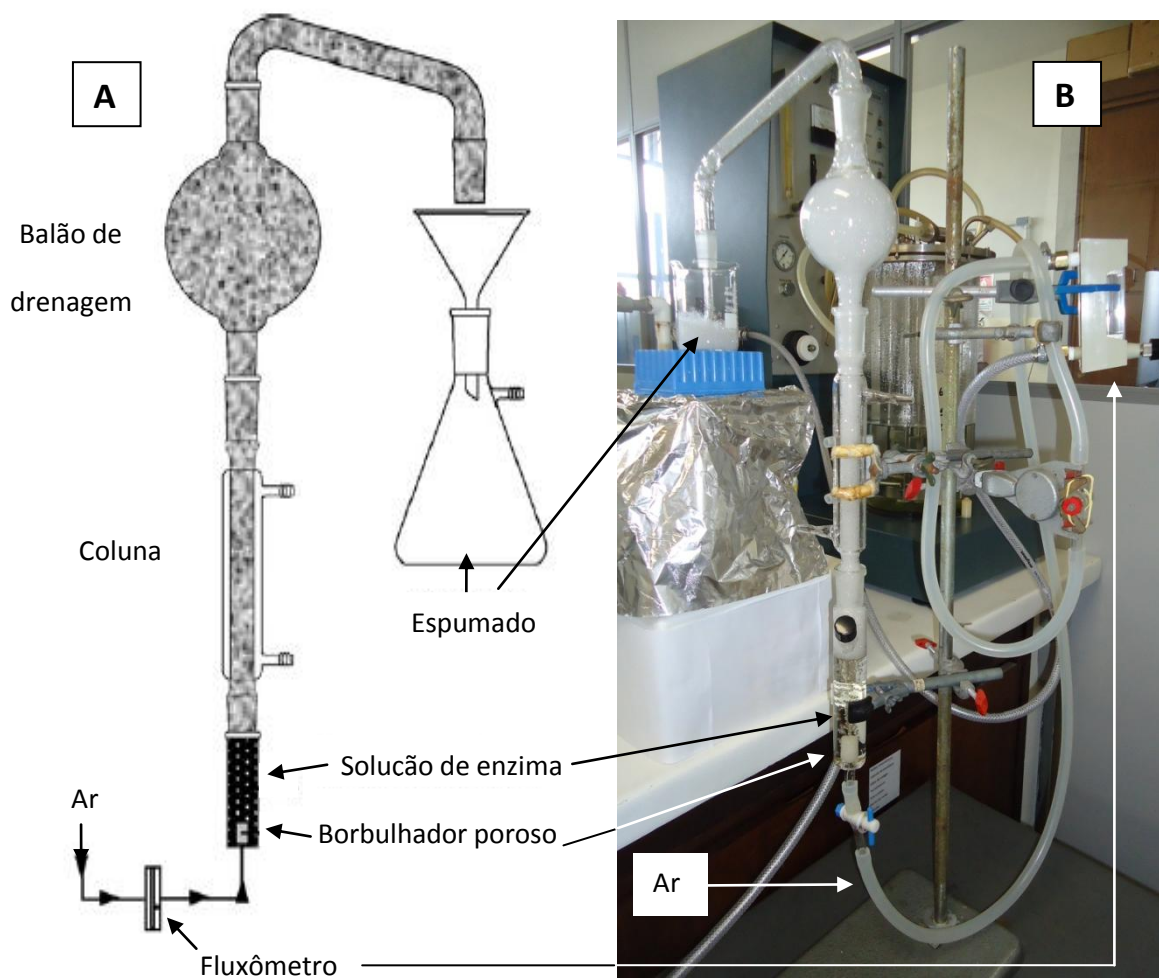


Figura 11. Aparato de fracionamento com espuma. A) Esquema segundo LINKE; BERGER, 2011. B) Equipamento utilizado nas presentes pesquisas.

No topo da coluna, as bolhas eventualmente se rompem e o líquido enriquecido que carregam é liberado na espuma. Para que ocorra fracionamento e/ou separação eficiente, é necessária certa altura de espuma acima do nível de líquido e certo grau de rompimento das bolhas. A espuma que deixa o topo da coluna de fracionamento é coletada e reliquefeita pela aplicação de vácuo leve, agitação, ultrassom, ou resfriamento, formando um espumado de pequeno volume e enriquecido no componente tensioativo (LOCKWOOD; BUMMER; JAY, 1997).

A eficiência alcançada em recuperar, enriquecer e purificar a proteína ou enzima de interesse após uma operação de fracionamento com espuma pode ser avaliada por algum dos seguintes parâmetros (LINKE et al., 2005, 2009; MERZ et al., 2009):

$$\text{Recuperação da proteína (Rp) (\%)} = \frac{\text{Massa (mg) de proteína no espumado} \times 100}{\text{Massa (mg) de proteína na solução inicial}}$$

$$\text{Recuperação da atividade (Ra) (\%)} = \frac{\text{Atividade total (U) no espumado} \times 100}{\text{Atividade total (U) na solução inicial}}$$

$$\text{Enriquecimento da proteína (Ep)} = \frac{\text{Proteína (mg mL}^{-1}\text{) no espumado}}{\text{Proteína (mg mL}^{-1}\text{) na solução inicial}}$$

$$\text{Enriquecimento da atividade (Ea)} = \frac{\text{Atividade (U mL}^{-1}\text{) do espumado}}{\text{Atividade (U mL}^{-1}\text{) da solução inicial}}$$

$$\text{Purificação (P)} = \frac{\text{Atividade específica (U mg}^{-1}\text{ proteína) do espumado}}{\text{Atividade específica (U mg}^{-1}\text{ proteína) da solução inicial}}$$

As moléculas da interface líquido-gás se auto-orientam e formam filmes coesos que estabilizam a fase dispersa. Enquanto a região hidrofóbica das moléculas se orienta para a fase gasosa, a região hidrofílica se orienta em direção ao líquido. A espuma ascende na coluna, enquanto fenômenos físicos como drenagem, coalescência e desproporção diminuem continuamente o volume da espuma devido ao refluxo do excesso de líquido (LINKE; BERGER, 2011). Ocorre a coalescência quando duas bolhas, separadas por uma lamela muito fina, se unem originando uma bolha maior (CLARK, 1995). Na desproporção, o gás da bolha menor difunde para a bolha maior através da lamela que as separa, efeito resultante da maior pressão de gás existente na bolha menor (DAMODARAN, 1997; MURRAY et al., 2005).

Os solutos não adsorvidos, que são transportados na fase líquida, drenam pela ação da gravidade ao longo das lamelas e bordas Plateau de volta ao retentato, e as moléculas alvo tornam-se enriquecidas na espuma (LOCKWOOD; BUMMER; JAY, 1997).

A Figura 12 apresenta os fenômenos físicos envolvidos durante o fracionamento. Estabelece-se, assim, um sistema em contra-corrente, onde as bolhas que ascendem, trazendo uma interface pobre em moléculas alvo, entram em contato com líquido cada vez mais enriquecido, proveniente das bolhas que se rompem, e que está drenando do topo da coluna. Formam-se assim sucessivas zonas de equilíbrio de moléculas de diferente hidrofobicidade, tal como separadas em uma cromatografia (BURGHOFF, 2012). Quando a concentração proteica da solução não permite mais a formação de filmes estáveis, a espuma colapsa.

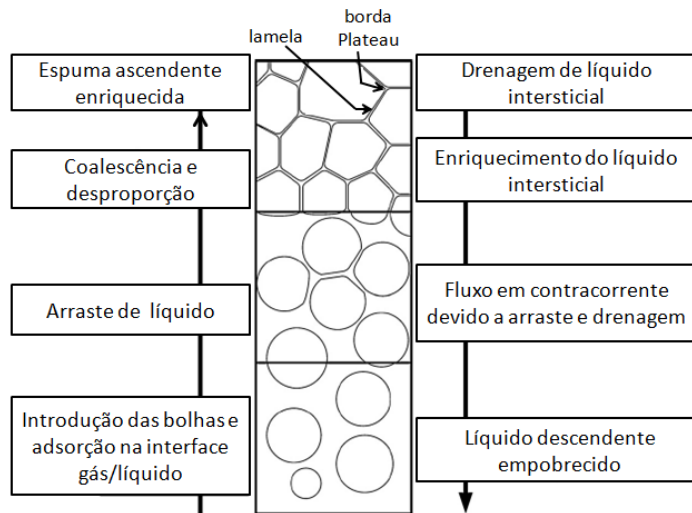


Figura 12. Fenômenos físicos durante o fracionamento com espuma (BURGHOFF, 2012).

#### 4.2.1 Adsorção de moléculas na interface líquido-gás

Enzimas, por serem compostas de aminoácidos que apresentam caráter hidrofóbico ou hidrofílico variado, constituem-se em espécies proteicas que agem como tensoativos quando adsorvidas numa interface gás-líquido, facilitando a formação de espuma. No caso de soluções de proteínas globulares ou soluções mistas de globulares e fibrosas, a adsorção está sob o controle da difusão e depende da velocidade de chegada de cada espécie proteica à interface. No caso de soluções contendo somente proteínas fibrosas, a adsorção é termodinamicamente controlada, ocorrendo devido a diferenças de energia. Em ambos os casos, porém, as moléculas proteicas em solução estão rodeadas de uma estrutura regular de moléculas de água de hidratação. Ao adsorverem à interface gás-líquido e ao ocorrer a inserção da região hidrofóbica na fase gasosa, as proteínas perdem parte dessas moléculas de água - aquelas que formam uma cápsula, o clatrato, ao redor das regiões hidrofóbicas. O processo é exoergônico, a energia do sistema diminui, tornando-se mais estável (DAMODARAN, 1997).

Na interface, as proteínas formam uma camada coesa de moléculas, que conferem propriedades viscoelásticas ao filme, cujas características dependem da estrutura conformacional da molécula proteica. A coesão é derivada de interações

molécula-molécula, resultando na formação de uma camada semelhante a um gel. Quando este filme viscoelástico é submetido a estiramento, como ocorre na desproporção entre bolhas, as moléculas proteicas têm dificuldade em difundir lateralmente devido à coesão e sofrem deformação para se ajustarem à nova área disponível (DAMODARAN, 1997).

Devido à forte coesão, os filmes estabilizados por proteínas são muito mais rígidos do que os estabilizados por surfactantes de baixo peso molecular (SBPM). Quando um filme estabilizado por SBPM é estirado, ocorre uma redução da espessura do filme naquele local, acompanhado pela formação de um gradiente de tensão superficial ao longo da região mais delgada. A tensão superficial é mais alta no local mais fino do filme tensionado. A tensão superficial de equilíbrio é restaurada pela difusão lateral de moléculas de surfactante adsorvidas nas regiões adjacentes em direção à região de tensão superficial mais alta. Este processo é denominado efeito Marangoni (CLARK, 1995). Os SBPM, como SDS (dodecilsulfato de sódio), Triton, Tween, mono e diglicerídios e outros, reduzem a tensão superficial em maior grau do que as proteínas, porém suas espumas são menos estáveis (SAHIN; SUMNU, 2006; DAMODARAN, 1997).

No estado estacionário, a concentração de moléculas tensioativas adsorvidas na interface é maior do que aquela presente em solução. A adsorção, porém, depende da concentração das moléculas em solução. Concentrações acima da concentração micelar crítica têm efeito adverso na adsorção, pois as moléculas então tendem a formar micelas espontaneamente, não estando disponíveis para a adsorção (CHARM et al., 1966). A concentração ótima para adsorção está entre  $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> (LINKE; BERGER, 2011).

A força de adsorção na interface está diretamente relacionada à hidrofobicidade da molécula proteica. Apesar de todas as proteínas serem anfifílicas e apresentarem porcentagens relativamente iguais de resíduos de aminoácidos polares e apolares, foi observado que elas se diferenciam quanto à sua capacidade tensioativa. A grande diferença em sua atividade superficial está relacionada às diferenças na conformação e na suscetibilidade dessa conformação de se desenovelar nas interfaces (DAMODARAN, 1997).

Proteínas de baixa estabilidade conformacional na interface e maior hidrofobicidade apresentam adsorção mais rápida, sendo a instabilidade conformacional o fator mais importante (CLARKSON; CUI; DARTON, 1999). Assim, os fatores moleculares que influenciam a atividade superficial das proteínas estão ligados à flexibilidade, estabilidade conformacional na interface, rápida adaptabilidade da conformação às mudanças do ambiente e ao padrão de distribuição dos resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos na estrutura primária e na superfície enovelada da proteína (DAMODARAN, 1997).

Porém, o desenovelamento da molécula proteica na interface causa a desnaturação da mesma, condição que pode ser reversível ou não, variando conforme a proteína e as condições às quais foi submetida (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). Havendo pequeno número de ligações dissulfídicas na molécula proteica, aumenta a probabilidade de desenovelamento na interface. Além disso, fluxos mais elevados de gás durante o fracionamento aumentam as forças de cisalhamento, que, acompanhadas de reações químicas da proteína com gases não inertes, podem colocar em risco a integridade estrutural proteica (LINKE; BERGER, 2011). Mesmo assim, lipases fúngicas e lacases, que contém apenas duas ligações dissulfeto, foram fracionadas com sucesso (LINKE et al., 2005; GERKEN et al., 2006; DOS PRAZERES et al., 2007; LINKE et al., 2007).

O pH da solução influencia diretamente o caráter hidrofóbico da molécula proteica. Proteínas/enzimas apresentam sua máxima atividade superficial quando estão em seu ponto isoelétrico ( $pI$ ). No  $pI$  as cargas eletrostáticas da molécula se anulam e ocorre menor repulsão entre elas, resultando em maior compactação na interface líquido-gás (CHARM et al., 1966; ROSS, 1980). Devido à diferença em seus pontos isoelétricos e, portanto, na força de adsorção à interface e consequente atividade interfacial, as proteínas/enzimas de uma solução aquosa mista podem ser seletivamente fracionadas com espuma e retiradas do sistema (LINKE et al., 2009).

#### 4.2.2 Estabilidade da espuma

A espuma é uma dispersão de gás em um líquido, na qual as bolhas encontram-se distorcidas sob a forma poliédrica e estão separadas por finas lamelas. Três lamelas finas adjacentes se interseccionam em uma borda Plateau e a fase contínua, o líquido, está interconectada através de uma malha de bordas Plateau (Figura 13).

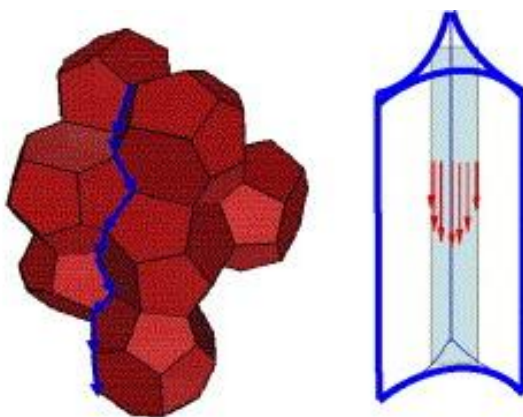


Figura 13. Bolhas poliédricas em espumas e a sucção das bordas Plateau (WANG; NARSIMHAN, 2006).

Vários processos macroscópicos influenciam a estabilidade cinética das espumas estabilizadas por proteínas. Estes processos são a drenagem de líquido das lamelas, o efeito Marangoni, a coalescência e a desproporção.

A drenagem resulta de diferenças de pressão entre as lamelas e as bordas Plateau, ocasionando um fluxo de líquido intersticial das lamelas em direção aos canais das bordas. Nas bordas Plateau, a ação da gravidade gera efeito de sucção no líquido, devolvendo-o ao retentato. Devido à drenagem, a espuma se torna cada vez mais seca e mais enriquecida em moléculas proteicas. O processo continua até que a lamela atinge a espessura de 100 nm, quando então se rompe, liberando líquido muito enriquecido (LINKE; BERGER, 2011).

Coalescência e desproporção (“disproportionation” ou “Ostwald ripening”) também influenciam a estabilidade da espuma. Coalescência é resultante da união de duas bolhas separadas por uma lamela muito fina, gerando uma bolha maior. A desproporção é difusão do gás de uma bolha menor para uma bolha maior, através da lamela que as separa, devido à maior pressão do gás existente em bolhas menores, com o conseqüente desaparecimento da bolha menor (DAMODARAN, 1997). Coalescência e desproporção geram bolhas maiores que apresentam menor relação área/volume e, por conseguinte, menor área de lamelas, resultando em diminuição no volume de líquido intersticial e maior enriquecimento em moléculas proteicas (URAIZEE; NARSIMHAN, 1996).

#### 4.2.3 Efeito do pH

Em seu ponto isoelétrico, a proteína/enzima apresenta a máxima hidrofobicidade e a maior capacidade tensioativa, apesar do risco de precipitação e agregação molecular. Assim, o transporte da proteína para a espuma é eficiente no  $pI$  (LOCKWOOD; BUMMER; JAY, 1997), como atestam a melhor recuperação de cutinase quando o pH da solução estava próximo ao seu  $pI$  (MERZ et al, 2009), bem como a melhor separação entre invertase e  $\alpha$ -amilase quando o fracionamento foi efetuado em pH próximo ao  $pI$  de cada uma delas (LOHA; TANNER; PROKOP, 1997).

Entretanto, foi observado que certas proteínas/enzimas formam mais espuma e que esta é mais estável quando o pH da solução está longe do  $pI$  (BACON et al., 1988). O fracionamento com espuma da proteína esporamina e da  $\beta$ -amilase a partir de extrato aquoso de batata doce foi mais eficiente em pH 5 e pH 3, respectivamente, evidenciando a importância do ajuste adequado do pH (CHAI et al., 1998). A esporamina apresenta  $pI = 3$  (CHERRY et al., 2000). Assim, um dos aspectos benéficos do fracionamento com espuma é a possibilidade de fracionar proteínas diferentes a partir de soluções aquosas complexas através da variação do pH.



Também é possível obter melhor recuperação da proteína no espumado quando a solução está em pH diferente do *pI*, devido à maior coalescência (URAZEE; NARSIMHAN, 1996). Várias enzimas/proteínas apresentaram maior recuperação em pH afastado 3 a 4 unidades de seu *pI* (Tabela 4). Além disso, a estabilidade da atividade enzimática não parece estar fortemente correlacionada ao ponto isoelétrico. Assim, o fracionamento com espuma necessita ser otimizado para cada caso visando preservar a atividade catalítica (LINKE; BERGER, 2011).

Tabela 4. Ponto isoelétrico de enzimas e seu pH de máxima recuperação durante o fracionamento com espuma.

Enzima	Ponto isoelétrico	pH de máxima recuperação	Causa atribuída a	Referência
Celulases ( <i>Trichoderma reesei</i> )	3,5 – 6,5 <sup>a</sup>	8 - 9	Alterações na estrutura molecular em pH 8 - 9	Loha et al., 1999
Lipases ( <i>Pleurotus sapidus</i> )	4,5 – 5,4	7	Resíduos de Tween 80 no caldo de cultivo	Linke et al., 2005
Lacase ( <i>Trametes spec.</i> )	3,3	5,5	Espumante CTAB* estabiliza lacase em pH≠ <i>pI</i> e melhora adsorção <sup>b</sup>	Linke et al., 2007
Esterase A ( <i>Pleurotus sapidus</i> )	4,5	7	Resíduos de Tween 80 no caldo de cultivo	Linke et al., 2009

<sup>a</sup>(VINZANT et al., 2001). <sup>b</sup>(BURGHOFF, 2012). \*CTAB = brometo de cetiltrimetilamônio.

#### 4.2.4 Efeito da concentração de proteína

A concentração de proteína obtida no espumado apresenta relação inversa com a concentração proteica da solução de alimentação. Soluções mais

concentradas produzem maior volume de espumado, porém menos rico em proteína. Maior concentração de proteína na solução de alimentação favorece a formação de espumas mais estáveis, contendo mais líquido intersticial, com conseqüente diminuição na concentração proteica e no enriquecimento do espumado (BROWN; KAUL; VARLEY, 1999ab). A concentração proteica na espuma influencia a viscosidade dos filmes e das bordas Plateau, afetando a drenagem devido ao aprisionamento de líquido nas lamelas (BURGHOFF, 2012). Soluções de menor concentração formam filmes de menor viscosidade na interface gás-líquido, resultando em drenagem mais rápida da espuma (URAZEE; NARSIMHAN, 1996).

O grau de redução da tensão superficial na interface depende da concentração de moléculas proteicas presentes, sendo mais elevado quanto maior a concentração, até atingir um limite acima do qual não há mais redução, chamada de concentração crítica. Abaixo dessa concentração ótima, apenas filmes proteicos diluídos formam-se na interface. Em soluções muito diluídas, a capacidade de formação de espuma é mínima, já que a tensão superficial nesse caso é muito próxima daquela da água. Além disso, filmes proteicos diluídos apresentam grande área disponível para o desenovelamento da proteína e sua conseqüente desnaturação (LOCKWOOD; BUMMER; JAY, 1997; BROWN; KAUL; VARLEY, 1999b).

#### **4.2.5 Aditivos**

A dificuldade em formar uma espuma estável, que certas soluções proteicas apresentam, pode ser contornada pela adição de tensoativos-detergentes. Os surfactantes de baixo peso molecular têm maior atividade tensioativa e difundem mais rapidamente até a interface do que as proteínas. Tween 80 difunde rapidamente, enquanto que proteína isolada de soro de leite – cujo componente principal é a  $\beta$ -lactoglobulina - leva aproximadamente 20 segundos até atingir a interface gás-líquido. Isto se deve à diferente mobilidade baseada nos diferentes pesos e tamanhos moleculares do detergente e da proteína (BURGHOFF, 2012). A

mesma competição pela interface gás-líquido ocorre em misturas proteína-proteína e também são dependentes do tempo (LOCKWOOD; BUMMER; JAY, 1997).

A adição de agentes espumantes geralmente aumenta a recuperação da proteína, enquanto diminui o enriquecimento, devido à adsorção competitiva entre as moléculas do surfactante e a proteína, à manutenção de bolhas menores (coalescência e desproporção diminuídas) e menor drenagem. Porém, efeitos negativos sobre o enriquecimento e a recuperação também foram observados com o uso de Tween 20 e Tween 80 (DAMODARAN, 1997; BURGHOFF, 2012), bem como o rompimento das interações proteína-proteína em filmes proteicos pela presença de Tween 20 (CLARK, 1995).

Os detergentes utilizados podem ser aniônicos, catiônicos, não iônicos, zwitteriônicos, tais como Tween 80, Triton X-100, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), dodecil sulfato de sódio (SDS), saponina, betaína e outros. Alguns são inibidores enzimáticos, como os iônicos CTAB e SDS, porém foi possível remover CTAB de espumado de lacase utilizando SDS e restaurar a atividade da enzima (LINKE et al., 2007). Outros aditivos podem ser sais, como sulfato de amônio, cloreto de sódio, sulfato de sódio, que aumentam a hidrofobicidade da proteína/enzima ao agirem sobre a água de hidratação que circunda as moléculas (CHARM et al., 1966). Etanol, metanol e n-propanol aumentaram a capacidade espumante da solução de albumina sérica bovina devido a alterarem a sua estrutura proteica (LINKE; BERGER, 2011).

Porém, na escolha do surfactante há que levar em conta o uso futuro da proteína, já que vários deles colocam em risco a “eco-compatibilidade” não apenas do produto final, mas de todo o processo (LINKE; BERGER, 2011).

#### **4.2.6 Dimensionamento do equipamento**

Enriquecimentos maiores são obtidos com colunas de espuma mais longas, devido a estas proporcionarem maior coalescência e drenagem, gerando espumas mais secas e concentradas. Por outro lado, uma coluna de espuma menor favorece

a recuperação (URAZEE; NARSIMHAN, 1990; URAIZEE; NARSIMHAN, 1996; BROWN; KAUL; VARLEY, 1999b).

Há, porém, um limite para a altura, a partir do qual cessa a recuperação de espuma devido à excessiva drenagem e rompimento das bolhas. Este limite na altura está relacionado ao diâmetro da coluna. Uma alternativa para prolongar o tempo de residência da espuma sem aumentar a altura da coluna é utilizar um balão de drenagem (Figura 11), favorecendo desta forma a recuperação e o enriquecimento (LINKE; BERGER, 2011).

#### **4.2.7 Efeito do gás**

Vários tipos de gás podem ser utilizados, a escolha dependendo das condições econômicas e de possíveis reações entre a proteína/enzima e o gás. Foi utilizado ar para separar celulase de lisozima, com adição de CTAB ou SDS, respectivamente. Neste caso, perda parcial de atividade da celulase foi atribuída à interação com o CTAB, porém a lisozima reteve sua capacidade catalítica (BURAPATANA; PROKOP; TANNER, 2005). Também foi utilizado ar na separação de bromelina (ACKERMANN et al., 2003) e celulasas (ZHANG, 2007) e não encontrou-se diferença na recuperação de lacase quando ar foi utilizado em vez de nitrogênio (LINKE et al., 2007).

O nitrogênio, por ser um gás inerte, foi preferencialmente utilizado com enzimas na separação de lipases, lacases e esterases (LINKE et al., 2005, 2006, 2009), lipases (DOS PRAZERES et al., 2007) e catalase (CHARM et al., 1966). Tripsina e catalase foram separadas utilizando CO<sub>2</sub>, porém com redução na atividade (LINKE; BERGER, 2011).

A velocidade superficial do gás ( $[\text{vazão volumétrica do gás}] / [\text{área da seção reta da coluna}]$ ) afeta a recuperação da proteína, bem como o enriquecimento do espumado. Altas velocidades superficiais favorecem a recuperação em detrimento do enriquecimento, já que mais bolhas de gás são formadas e, conseqüentemente, há maior área de adsorção. Porém, ocorre menor tempo de residência na coluna e a

dispersão gasosa arrasta quantidade maior de líquido intersticial juntamente com solutos hidrofílicos. Assim, o fluxo de gás pode ser utilizado para dirigir o fracionamento para a recuperação de proteína ou para o enriquecimento. Entretanto, foi possível obter uma alta recuperação (96,3 %) concomitante com alto enriquecimento (48,18) na separação de proteínas de soro de leite (MUKHOPADHYAY; KHANAM; NANDA, 2010).

O uso de diferentes velocidades superficiais do gás durante um mesmo processo foi utilizado para fracionar espécies proteicas diferentes (esterases de peptidases) presentes em uma mistura (LINKE et al., 2009).

#### **4.2.8 Nível de líquido**

Colunas mais altas de líquido permitem contato mais prolongado da interface das bolhas com o soluto tensioativo. Foi obtida melhor separação de urease através do aumento do nível de líquido (LINKE; BERGER, 2011). Entretanto, há uma altura máxima de líquido na qual se estabelece a concentração de equilíbrio da proteína em solução e na interface, a partir da qual não ocorre adsorção adicional. (URAZEE; NARSIMHAN, 1996).

#### **4.2.9 Efeito do tamanho das bolhas**

O tamanho das bolhas é determinado pela porosidade do gerador de bolhas, seja ele um “frit” ou uma placa. Bolhas menores apresentam maior proporção área/volume do que bolhas maiores, o que permite adsorção de quantidades mais elevadas de moléculas proteicas. Entretanto, este efeito também determina maior quantidade de líquido intersticial na dispersão gasosa, pois há maior quantidade de lamelas presentes, favorecendo a recuperação de proteína em oposição ao enriquecimento. No caso de bolhas maiores, a maior drenagem favorece a

coalescência e o enriquecimento (BROWN; KAUL; VARLEY, 1999b; URAIZEE; NARSIMHAN, 1996; BURGHOFF, 2012).

As bolhas, ao ascenderem na coluna, sofrem coalescência e desproporção. Ambos os fenômenos têm como efeito o aumento do volume das bolhas, com conseqüente redução da área da interface. Quando duas bolhas esféricas de 0,5 mm de diâmetro coalescem formando uma única, ocorre redução de 20 % na área da interface. Devido à perda de área, moléculas do soluto tensoativo são obrigadas a retornar ao líquido intersticial, influenciando na viscosidade e drenagem (LOCKWOOD; BUMMER; JAY, 1997).

#### 4.2.10 Modos de fracionamento

Existem diversos modos de utilização das colunas de fracionamento com espuma (Figura 14):

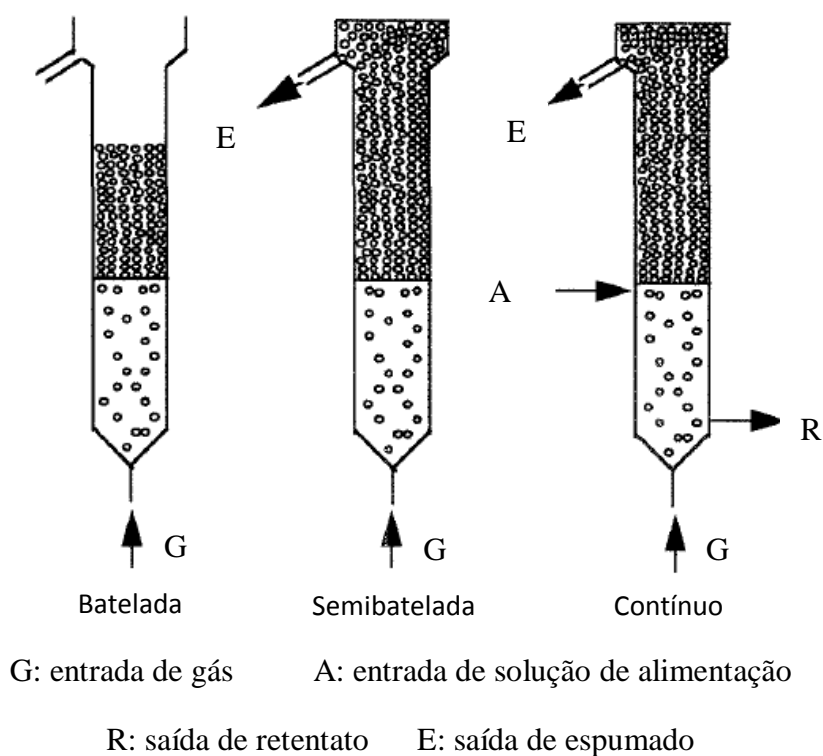


Figura 14. Modos de operação de colunas de fracionamento com espuma (ROSA, 1996).

- i. Batelada – neste tipo operação uma quantidade definida de solução proteica é colocada na coluna de fracionamento e o fluxo de gás acionado a um valor desejado de velocidade superficial, até que a coluna de espuma atinja uma altura pré-determinada. O suprimento de gás é interrompido e o sistema é deixado em repouso pelo tempo de drenagem desejado. A espuma é separada do líquido (retentato), rompida, obtendo-se assim o espumado de alta concentração em proteína.
- ii. Semibatelada – a solução proteica é introduzida na coluna, iniciando-se a alimentação do gás na vazão desejada. A espuma formada é coletada no topo da coluna de fracionamento e rompida. Neste sistema a altura da coluna de líquido, a vazão de espuma, o diâmetro das bolhas e as concentrações de proteína na espuma e na coluna de líquido variam em função do tempo.
- iii. Contínuo – este tipo de fracionamento com espuma é caracterizado pela alimentação contínua da solução proteica, bem como pela constância dos parâmetros do sistema ao longo do tempo (PERNA, 2007).

O fracionamento com espuma permite o aumento de escala, seja pelo aumento das dimensões da coluna, ou pela utilização de várias colunas em paralelo, ou ainda pelo modo contínuo de um equipamento pequeno. A solução de alimentação pode ser introduzida pelo fundo, um pouco acima da coluna de líquido ou pelo topo da coluna de fracionamento (BURGHOFF, 2012). Há relato da obtenção de maior enriquecimento, no modo contínuo, com a alimentação através do topo da coluna diretamente sobre a espuma (LINKE; BERGER, 2011). A vazão de alimentação, bem como a vazão de saída do retentato, influem no enriquecimento e recuperação do espumado (BROWN; KAUL; VARLEY, 1999b). A coluna em modo contínuo pode estar diretamente acoplada a um fermentador e foi utilizada por Rao et al. (2009) para separar surfactina, obtendo um fator de enriquecimento = 50. Também existe a possibilidade de utilizar o refluxo externo de espuma para o topo da coluna, obtendo-se assim um aumento no enriquecimento do espumado (DE LUCENA, MIRANDA; SANTANA, 1996).

#### **4.2.11 Aplicações**

O efeito desnaturante sobre a proteína, causado pelo fracionamento com espuma, foi considerado uma desvantagem desse método (BROWN; KAUL; VARLEY, 1999a), tendo motivado seu abandono por muito tempo para fins de purificação de proteínas com atividade catalítica. Porém, as inúmeras enzimas que têm sido separadas e purificadas, atingindo recuperação e enriquecimento em variados graus, demonstram a potencialidade do método. A Tabela 5 apresenta vários exemplos de sua aplicação.



Tabela 5. Enzimas concentradas e/ou purificadas por fracionamento com espuma.

Enzima	Preparação	Eficiência		
		R	E	P
Amilase	Solução aquosa	97		1,3
Carboxipeptidase A	Solução aquosa	95,3	18,8	
Catalase	Solução aquosa binária	61	11	6
	Solução aquosa	83		2,3
Cutinase	Caldo de cultivo filtrado	79	10,5	2,5
Esterase	Caldo de cultivo	95	11,6	28
$\beta$ -glicosidase	Solução aquosa	93		
Lacase	Caldo de cultivo filtrado	70	3,1	
	Solução aquosa	66,3	13,3	
Lisozima	Solução aquosa	86	3,3	
	Extrato de clara de ovo	84		7,5
Metaloprotease	Solução aquosa	87,3	12	
Pepsina	Solução aquosa binária			7,4
Peroxidase	Solução aquosa	85,3	17,8	
Fosfatase	Extrato de glândula prostática	95		15
Protease	Extratos de placenta humana	80		4,2
Estreptoquinase	Caldo de cultivo filtrado	85	3,4	
Urease	Solução aquosa	84		3,1

R: recuperação em %. E: enriquecimento. P: purificação. (LINKE; BERGER, 2011)

## JUSTIFICATIVA

Existem vários estudos sobre enzimas celulolíticas produzidas por *Macrophomina phaseolina* visando elucidar mecanismos de patogenicidade. Entretanto, existem poucos trabalhos sobre outras hidrolases extracelulares, produzidas pelo fitopatógeno, com possível aplicação industrial. Estes geralmente utilizam um ou dois isolados, não permitindo evidenciar a variabilidade entre isolados na produção dessas hidrolases.

Na literatura, não foram encontrados estudos sobre a velocidade de crescimento do patógeno sobre diferentes substratos. A sua maior ou menor habilidade em utilizar os diversos nutrientes, especialmente através da produção de enzimas extracelulares para promover a multiplicação de seu micélio, reflete no seu crescimento. A comparação entre os parâmetros “velocidade de crescimento sobre determinado substrato” e “produção da correspondente hidrolase extracelular” permite selecionar, entre os vários isolados, aquele(s) melhor adaptado(s) para a obtenção de determinada hidrolase.

O fracionamento com espuma, método baseado na adsorção em bolhas de gás utilizado para a recuperação e purificação de enzimas a partir de caldos de cultivo, é eficiente com baixo custo de instalação e operação, representando uma alternativa promissora para os caros métodos cromatográficos atualmente em uso na indústria.

## OBJETIVO GERAL

Selecionar isolados de *Macrophomina phaseolina* de rápido crescimento e produtores de complexos enzimáticos pectinolíticos, amilolíticos, proteolíticos e lipolíticos, bem como recuperar e purificar parcialmente complexos lipolíticos a partir de sobrenadantes de caldo de cultivo utilizando o fracionamento com espuma.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a velocidade de crescimento radial de 13 isolados de *M. phaseolina* em meio de cultivo semissólido contendo diversos substratos;
- Determinar a velocidade de crescimento radial dos 13 isolados em ágar batata-dextrose e comparar os resultados obtidos com outros estudos;
- Verificar a produção de hidrolases em meio semissólido contendo pectina, amido solúvel, gelatina, leite desnatado, azeite de oliva;
- Determinar, entre alguns isolados, aquele que apresenta maior produção de complexos enzimáticos lipolíticos em meio líquido, bem como estabelecer as melhores condições de cultivo para essa produção;
- Produzir, recuperar e purificar parcialmente complexos enzimáticos lipolíticos a partir de sobrenadantes de caldos de cultivo utilizando fracionamento com espuma no modo semibatelada;
- Verificar a presença de lipases no produto purificado obtido.

## **CAPÍTULO II – ESTUDOS PRELIMINARES E COMPLEMENTARES**

Neste Capítulo são apresentados os resultados não publicados de estudos preliminares, bem como de experimentos complementares realizados durante o andamento, para dar suporte aos objetivos do presente trabalho.

### **1 Material**

#### **1.1 Reagentes e equipamentos**

Os reagentes e meios de cultivo foram adquiridos de Himedia (Índia), Merck (Alemanha), SigmaAldrich (USA), Vetec and Nuclear (Brasil). Azeite de oliva extra-virgem foi de grau comercial (La Violetera, Espanha). Lipozyme TL 100 da Novozymes Latin America Ltda, albumina sérica bovina (BSA) da INLAB Alamar Tecno-Científica Ltda. (Brasil). O espectrofotômetro foi Wallac Envision 2104 Multilabel Reader (Perkin Elmer) utilizado com o software Wallac Envision Manager 1.12 para leitura das microplacas. Lâmpada de UV 350 nm para placa Rodamina B. Minifiltro Sartorius (Millipore) 0,2 µm foi utilizado para esterilização.

#### **1.2. Isolados de *Macrophomina phaseolina***

A Tabela 6 apresenta os isolados de *Macrophomina phaseolina* utilizados no presente estudo, o hospedeiro e o local de coleta do isolado, bem como a instituição provedora da amostra.

Tabela 6. Isolados de *Macrophomina phaseolina* e procedência das amostras.

Isolado <sup>a</sup>	Instituição <sup>b</sup>	Ano <sup>c</sup>	Localidade <sup>c</sup>	Hospedeiro <sup>c</sup>
AJAM	UFV	1999	Espírito Santo	Goiabeira ( <i>Psidium guajava</i> )
CMM 527	UFRPe	2007	Mossoró - RN	Melão ( <i>Cucumis melo</i> )
CMM 932	UFRPe	1998	Lajedo - Pe	Feijão ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
CMM 979	UFRPe	2003	Baraúna - RN	Melão ( <i>Cucumis melo</i> )
CMM 1048	UFRPe	2003	Mossoró - RN	Melão ( <i>Cucumis melo</i> )
CMM 1091	UFRPe	2002	Baraúna - RN	Melão ( <i>Cucumis melo</i> )
CMM 2100	UFRPe	2008	Teresina - PI	Feijão caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> )
CMM 2105	UFRPe	2008	Parnaíba - PI	Feijão caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> )
MMBF 0410	IB – SP	2004	Botucatu - SP	Feijão ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
MMBF 1698	IB – SP	1998	Mossoró - RN	Melão ( <i>Cucumis melo</i> )
MMBF 564	IB - SP	1966	Recife - PE	Feijão ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
MMBF 808	IB – SP	1968	Campinas–SP	Algodão ( <i>Gossypium sp.</i> )
PEL	UFPeI	2007	Pelotas – RS	Mamona ( <i>Ricinus communis</i> )

<sup>a</sup>Código do isolado. <sup>b</sup>Instituição provedora da amostra: UFV = Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia; UFRPe = Universidade Federal Rural de Pernambuco, Coleção de Culturas de Fungos Fitopatogênicos “Prof. Maria Menezes”; IB - SP = Instituto Biológico, Secretaria de Agricultura e abastecimento, Governo do Estado de São Paulo; UFPel = Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Fitossanidade. <sup>c</sup>Ano, localidade e hospedeiro de coleta da amostra.

## **2 Métodos**

### **2.1 Características morfológicas das colônias**

Cada isolado foi inoculado em triplicata sobre placas de ágar batata-dextrose em pH 6,8, incubados em estufa microbiológica a 30 °C por 7 dias, sendo então observadas as características morfológicas das colônias.

### **2.2 Efeito do pH, temperatura e tempo de incubação sobre o desenvolvimento da atividade lipolítica em meio líquido**

Os isolados CMM 2105, MMBF 0410 e PEL foram cultivados em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral líquido, contendo (por litro) 20 g Bacto proteose peptone nº 3, 0,6 g MgSO<sub>4</sub>, 1,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (COLEN; JUNQUEIRA; MORAES-SANTOS, 2006). Antes da esterilização, o pH dos caldos foi ajustado para 4,5, 5,5 e 6,5 com HCl 1 M. Os caldos foram adicionados de 1 % (v/v) de azeite de oliva pré-esterilizado por filtração, inoculados e incubados em mesa agitadora (160 rpm) a 25 °C, 30 °C, 35 °C e 40 °C por 96 h. Foram coletadas amostras do caldo a cada 24 h, filtradas sob vácuo e estocadas a -20 °C até a determinação da atividade lipolítica e da concentração proteica, bem como a realização da precipitação isoelétrica.

### **2.3 Precipitação isoelétrica**

Com a finalidade de determinar a faixa de pH na qual se situa o ponto isoelétrico das enzimas lipolíticas presentes no sobrenadante do caldo de cultivo de *M. phaseolina* MMBF 0410, foi efetuada a precipitação das proteínas em alíquotas do caldo utilizando tampões de vários pH (Tabela 7) (WALKER, 2000; ZHANG et al.,

2005). Caldo de cultivo (0,5 mL) foi adicionado a 1 mL de cada tampão, agitado por inversão e deixado em repouso a 8-10 °C por 8 horas. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 3 minutos. O sobrenadante foi retirado com micropipeta e descartado. O precipitado foi redissolvido em tampão de pH afastado em 1-2 unidades do pH de precipitação, conforme indicado na Tabela 7, e submetido à determinação da atividade lipolítica específica.

Tabela 7. Tampões utilizados na precipitação e na ressolubilização das proteínas do caldo de cultivo de *Macrophomina phaseolina*.

Tampão de precipitação		Tampão de ressolubilização	
	pH		pH
Acetato	3,6	Acetato	5,6
	4,4		5,6
Acetato	5,0	Fosfato	6,6
	5,6		6,6
Fosfato	5,8	Fosfato	8,0
	6,6		8,0
	7,0		5,8
Tris-HCl	7,6	Tris-HCl	8,6
	8,2		7,2
	8,6		7,2

#### 2.4 Determinação da atividade lipolítica de amostras líquidas

As amostras líquidas foram submetidas à determinação da atividade lipolítica em microplaca. Foi utilizado 4-nitrofenil palmitato como substrato, em tampão Tris-HCl pH 8, com incubação a 45 °C por 30 min. A absorbância das amostras foi

verificada a 410 nm ( $\epsilon = 15 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ) (VORDERWÜLBECKE; KIESLICH; ERDMANNT, 1992), utilizando como branco amostra inativada em banho de água fervente por 30 min. Uma unidade (U) de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de 4-nitrofenol por minuto por mL. A atividade lipolítica específica (U  $\text{mg}^{-1}$  proteína) foi calculada. A determinação foi feita em triplicata por amostra e os resultados representam as médias obtidas.

## **2.5 Determinação da concentração proteica**

A quantificação da proteína foi efetuada pelo método de Lowry em microplaca, utilizando curva padrão de albumina sérica bovina (LOWRY et al., 1951). As determinações foram efetuadas em triplicata e os valores representam as médias obtidas.

## **2.6 Determinação qualitativa de atividade lipolítica**

Para verificar a atividade hidrolítica sobre triacilgliceróis de cadeia normal (ác. graxos de 16 a 20 carbonos), as amostras de espumado (10  $\mu\text{L}$ ) que apresentaram purificação mais elevada foram inoculadas em poços de placas de ágar rodamina B, utilizando como controle positivo Lipozyme TL 100. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 4 dias e visualizadas sob luz UV 350 nm. O desenvolvimento de halo amarelo-alaranjado ao redor do poço de inoculação indica hidrólise dos triacilgliceróis. Cada amostra foi testada em duplicata (KOUKER; JAEGER, 1987).



### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Características morfológicas das colônias

Com exceção de AJAM, todos os isolados cresceram rapidamente, tomando toda a área das placas de ágar batata-dextrose. Mesmo após 7 dias de incubação, AJAM apresentou crescimento restrito com formação de colônias pequenas de aproximadamente 4 cm<sup>2</sup>.

A Tabela 8 e a Figura 15 apresentam as características morfológicas das colônias dos isolados de *M. phaseolina* do presente estudo. O relevo, a textura e as cores do micélio das colônias obtidas foram semelhantes às aquelas descritas na literatura (Figuras 2 e 3; MAYEK-PÉREZ; CASTAÑEDA; GALLEGOS, 1997; BEAS-FERNÁNDEZ et al., 2006).

Os isolados CMM 1048, CMM 2100, MMBF 0410, MMBF 1698 e PEL apresentaram setorização a partir de 72 h da inoculação, fenômeno já anteriormente relatado neste microrganismo (MAYEK-PÉREZ; CASTAÑEDA; GALLEGOS, 1997). Setores se formam quando algumas regiões da colônia apresentam maior velocidade de crescimento ou de coloração diferente do restante. A setorização em fungos filamentosos pode decorrer de heterocariose, de mutação ou do envelhecimento da colônia (LI et al, 1994; WANG; BUTT; ST LEGER, 2005). A provável existência de heterocariose em *M. phaseolina* foi considerada como uma das causas da sua variabilidade genética (ALMEIDA et al., 2003). O envelhecimento da colônia pode comprometer a habilidade de produzir enzimas e metabólitos (RYAN et al., 2002) e inóculos oriundos de um mesmo isolado poderão apresentar características fisiológicas e bioquímicas diferentes, dependendo da região da colônia que deu origem ao inóculo. Por esta razão, durante os trabalhos utilizou-se inóculo das regiões de crescimento ativo da colônia, situadas nas suas bordas.

Tabela 8. Morfologia das colônias de *M. phaseolina* em ágar batata-dextrose após 7 dias de cultivo a 30 °C.

Isolado	Bordas	Relevo	Textura	Setoriza- ção	Cor			Pigmento <sup>a</sup>
					Anverso		Verso	
					Centro	Borda		
AJAM	Irregular definida	Rugosa	Aveludada	Não	Negro	Cinza escuro	Negro	.-
CMM 527	Irregular penugenta	Plana	Coriácea com orifícios	Não	Branco		Salmão	Salmão
CMM 932	Irregular penugenta	Plana	Feltrada	Não	Cinza escuro		Negro	.-
CMM 979	Irregular penugenta	Plana	Algodonosa	Não	Cinza escuro	Cinza esverdeado	Negro	.-
CMM 1048	Irregular plumosa	Plana	Algodonosa	Sim	Cinza escuro azulado	Cinza escuro	Negro	.-
CMM 1091	Irregular penugenta	Plana	Algodonosa com orifícios	Não	Branco		Amarelo/marron	Amarelo
CMM 2100	Irregular plumosa	Plana	Feltrada/setores algodonosos	Sim	Branco, cinza escuro, cinza claro, marron		Amarelo/marron escuro/negro	Amarelo
CMM 2105	Irregular penugenta	Plana	Algodonosa	Não	Branco		Amarelo	Amarelo
MMBF 0410	Irregular penugenta	Plana	Centro membranoso/borda algodonosa	Sim	Cinza prateado	Cinza	Negro	.-
MMBF 1698	Irregular penugenta	Rugosa	Feltrada	Sim	Cinza escuro		Negro	.-
MMBF 564	Irregular penugenta	Plana	Centro membranoso/borda algodonosa	Não	Branco		Negro/cinza escuro	.-
MMBF 808	Irregular penugenta	Rugosa	Feltrada	Não	Cinza		Cinza escuro	.-
PEL	Irregular penugenta	Plana	Centro membranoso/borda algodonosa	Sim	Negro/cinza escuro		Negro	.-

<sup>a</sup>Produção de pigmento em ágar batata-dextrose.

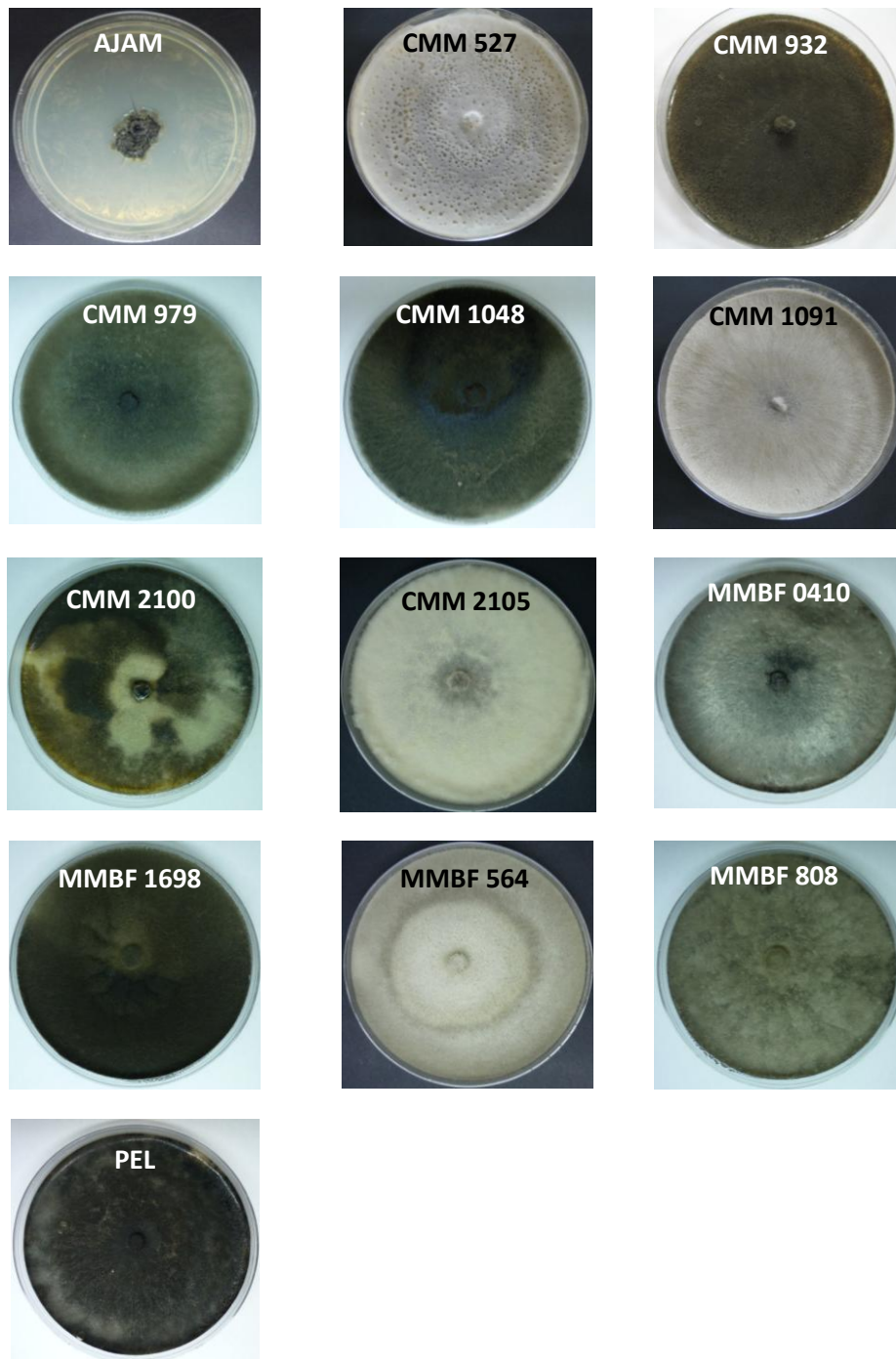


Figura 15. Morfologia das colônias de *Macrophomina phaseolina* em ágar batata-dextrose cultivadas a 30 °C por 7 dias (fotos: SCHINKE, C., 2010)

### 3.2 Efeito do pH, temperatura e tempo de incubação na atividade lipolítica extracelular em meio líquido

A Figura 16 apresenta a atividade lipolítica dos caldos de cultivo dos isolados CMM 2105, MMBF 0410 e PEL em diferentes tempos de crescimento, obtidos durante a incubação em diversos pH e temperaturas.

Observa-se que a atividade de todos os isolados foi mais alta quando cultivados a 30 °C e o isolado MMBF 0410 apresentou atividade superior aos demais em todas as temperaturas.

A influência do pH foi variável para cada isolado em função da temperatura e do tempo de incubação. A 25 °C e 35 °C, nos três pH, os cultivos dos três isolados apresentam o pico de atividade em 96 h. Já a 30 °C, o pico ocorreu entre 72 e 96 h, dependendo do isolado e do pH. Os três isolados do patógeno apresentaram dificuldade para se desenvolver a 40 °C, não apresentando atividade lipolítica até 72 h de cultivo. Em 96 h, porém, os três isolados desenvolveram baixos níveis de atividade, dependendo do pH. CMM 2105 apresentou atividade apenas em pH 5,5 ( $0,02 \pm 0,005$  mU mg<sup>-1</sup> proteína). MMBF 0410 apresentou atividade de  $0,4 \pm 0,09$ ,  $0,6 \pm 0,1$  e  $1,0 \pm 0,14$  mU mg<sup>-1</sup> proteína e PEL atividade de  $0,2 \pm 0,03$ ,  $0,2 \pm 0,03$  e  $1,3 \pm 0,02$  mU mg<sup>-1</sup> proteína em pH 4,5, 5,5 e 6,5, respectivamente.

As condições de 30 °C, pH 5,5, com 72 horas de incubação foram as mais adequadas para que MMBF 0410 apresentasse máxima produção de hidrolases lipolíticas ( $0,414 \pm 0,05$  U mg<sup>-1</sup> proteína). Assim, utilizaram-se estas condições de cultivo para a obtenção de sobrenadante destinado ao fracionamento com espuma.

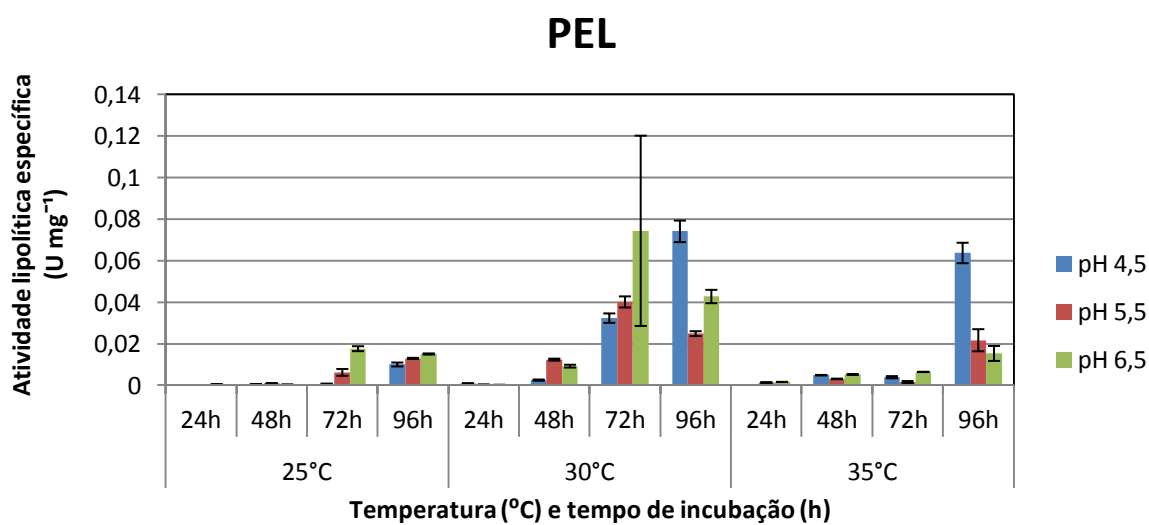
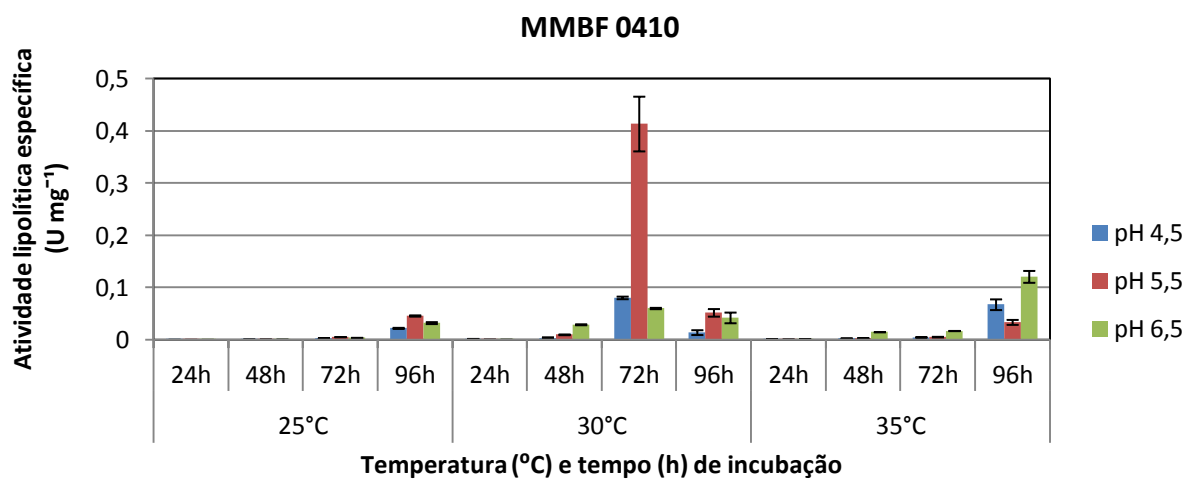
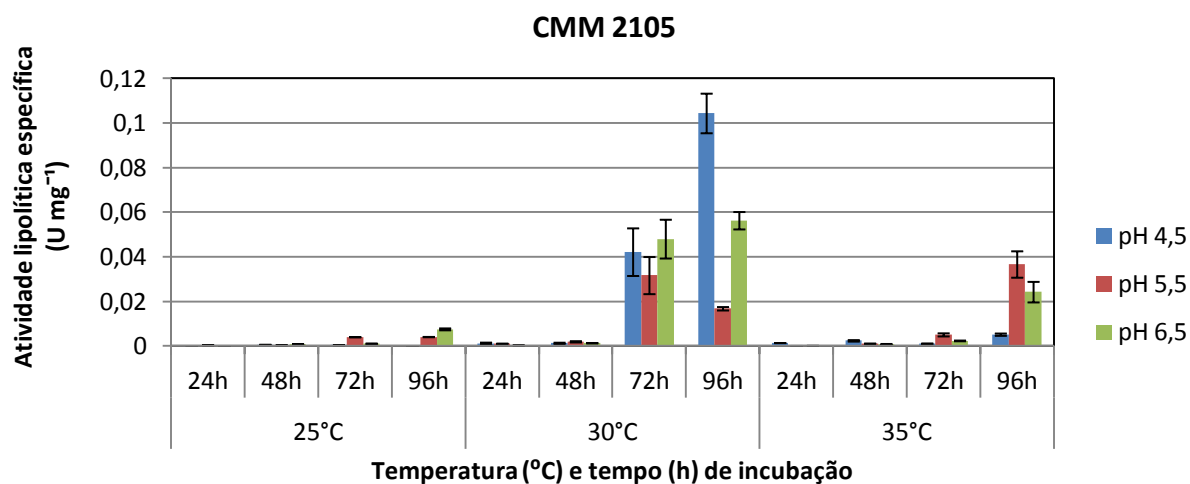


Figura 16. Influência do pH, temperatura e tempo de incubação na atividade lipolítica extracelular de *M. phaseolina* em meio mineral líquido contendo azeite de oliva.

### 3.3 Precipitação isoeétrica e atividade lipolítica das frações

A Figura 17 apresenta a atividade lipolítica ( $\text{U mL}^{-1}$ ) e atividade lipolítica específica ( $\text{U mg}^{-1}$  proteína) de cada fração obtida com os tampões nos diversos pH durante a precipitação do caldo de cultivo de *M. phaseolina* MMBF 0410 cultivado em caldo segundo Colen et al. (2006). Observa-se que, apesar da atividade lipolítica por mililitro de caldo ser mais elevada nas frações precipitadas entre pH 5,8 e 7, a atividade por massa de proteína precipitada, ou seja, a atividade específica, mostrou-se mais elevada e praticamente estável entre pH 5,6 e 7. Assim, escolheu-se efetuar o fracionamento com espuma ajustando o pH dos caldos para 5,8.

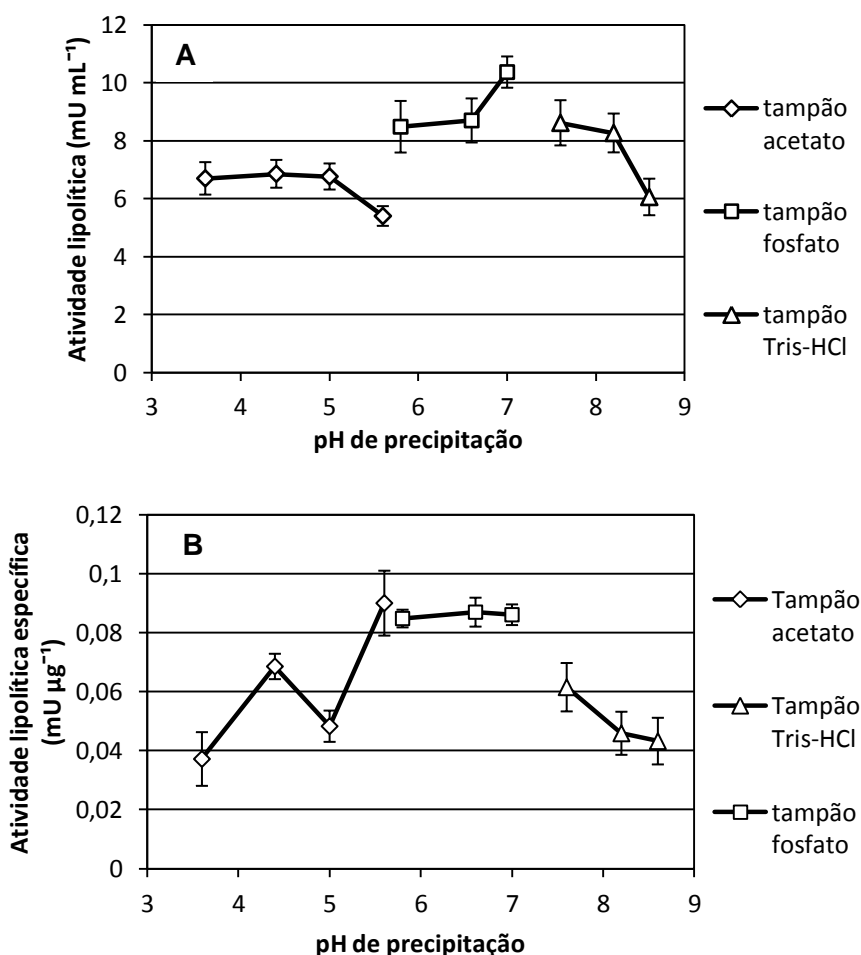


Figura 17. Atividade lipolítica (A) e atividade lipolítica específica (B) das frações obtidas na precipitação de caldo de cultivo de *M. phaseolina*, utilizando tampões de diversos pH.

### 3.4 Atividade lipolítica qualitativa

A Figura 18 apresenta os resultados da hidrólise de azeite de oliva com amostras de espumado e, no centro da placa, o controle positivo Lipozyme TL 100. Apenas a amostra coletada aos 50 minutos do segundo experimento de fracionamento de caldo simples apresentou resultado positivo (SCHINKE; GERMANI, 2013), evidenciando atividade hidrolítica sobre triacilgliceróis de ácidos graxos de cadeias normais (16-18 C). Esta amostra apresentou purificação de 4,4.

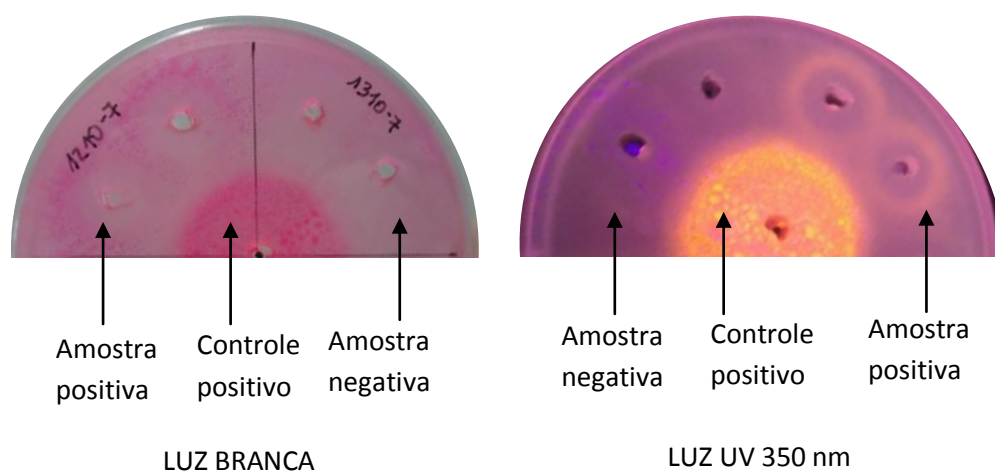


Figura 18. Atividade lipolítica de amostras de espumado de caldo de cultivo de *M. phaseolina* MMBF 0410 sobre triacilgliceróis de azeite de oliva em placa de rodamina B.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOSHOSHA, S. S. et al. Characterization of *Macrophomina phaseolina* isolates affecting sunflower growth in El-Behera Governorate, Egypt. **Int. J. Agri. Biol.**, Faisalabad, vol. 9, n. 6, p. 807-815, 2007.
- ACKERMANN JR. et al. Effect of invertase on the batch foam fractionation of bromelain. **Biotechn. Bioprocess. Eng.**, vol. 8, n.3, p. 167-172, 2003.
- ADENIRAN, H. A.; ABIOSE, S. H.; OGUNSUA, A. O. Production of fungal  $\beta$ -amylase and amyloglucosidase on some Nigerian agricultural residues. **Food. Bioprocess. Technol.**, vol. 3, p. 693–698, 2010.
- AFOUDA, L.; WOLF, G.; WYDRA, K. Development of a sensitive serological method for specific detection of latent infection of *Macrophomina phaseolina* in cowpea. **J. Phytopathol.**, vol. 157, p. 15–23, 2009.
- AGARWAL, D. K. *Macrophomina*: taxonomy, ecology, diseases and their management. In: MUKERJI K. G., MANOHARACHARY C. (ed.) **Taxonomy and ecology of Indian fungi**. New Delhi: IK International Publishing House, p. 59-78, 2010.
- AGARWAL, P. C. et al. Seedborne fungi identified from exotic pepper (*Capsicum* spp.) germplasm samples introduced during 1976–2005. **PGR Newsl., FAO-Bioversity**, vol. 149, p. 39-42, 2009.
- ABIOVE reduz projeção de produção brasileira de soja na safra 2013/2014. **Agência Estado**, 17/04/2013. Disponível em:  
<[http://www.abiove.org.br/site/\\_FILES/Portugues/17042013-222147-agencia\\_estado\\_17\\_abril\\_2013.pdf](http://www.abiove.org.br/site/_FILES/Portugues/17042013-222147-agencia_estado_17_abril_2013.pdf)>. Acesso em: 20 abr. 2013.
- AHLAWAT, S. et al. Potential application of alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* SS in pulp and paper industry. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, vol. 149, 287–293, 2008.
- AHLAWAT, S. et al. Production of thermostable pectinase and xylanase for their potential application in bleaching of kraft pulp. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, vol. 34, 763–770, 2007.
- AHLAWAT, S. Pectinase production by *Bacillus subtilis* and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. **Process Biochem.**, vol. 44, 521–526, 2009.
- AHMAD, Y.; HAMEED, A.; GHAFAR, A. Enzymatic activity of fungal pathogens in corn. **Pak. J. Bot.**, vol. 38, n. 4, p. 1305-1316, 2006.
- AIYER, P. V. Amylases and their applications. **Afr. J. Biotechnol.**, vol. 4, n. 13, p. 1525-1529, Dec. 2005.
- ALI, M. M. et al. Relationship of pectic enzyme of *Macrophomina phaseoli* with stem-rot disease and retting of jute. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, vol. 38, n. 3, p. 289-298, 1969.



- ALMEIDA, A. M. R. et al. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. **Fitopatol. bras.**, vol. 28, n. 3, p. 279-285, maio-jun. 2003.
- AMMON, V.; WYLLIE, T. D.; BROWN JR., M. F. An ultrastructural investigation of pathological alterations induced by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in seedlings of soybean, *Glycine max* (L.) Merril. **Physiol. Plant. Pathol.**, vol. 4, n. 1, p. 1-2, 1974.
- AMMON, V.; WYLLIE, T. D.; BROWN JR., M. F. Investigation of the infection process of *Macrophomina phaseolina* on the surface of soybean roots using scanning electron microscopy. **Mycopathologia**, vol. 55, n. 2, p. 77-81, 1975.
- ANSEJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Challenges and trends in bioseparations. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, vol. 83, p. 117–120, 2008.
- ASA - AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION. **Soystats 2012 – a reference guide to important soybean facts and figures**. Disponível em: <<http://www.soystats.com/2012/default.htm>>. Acesso em: 01 fev. 2013.
- ASLAM, A. et al. *In vitro* antifungal activity of selected medicinal plant diffusates against *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina*. **Pak. J. Bot.**, vol. 42, n. 4, p. 2911-2919, 2010.
- BACON, I. R. et al. Characterization of the foaming properties of lysozymes and  $\alpha$ -lactalbumins: a structural evaluation. **Food Hydrocoll.**, vol. 2, n. 3, p. 225-245, 1988.
- BAGYALAKSHMI, R. et al. Newer emerging pathogens of ocular non-sporulating molds (NSM) identified by polymerase chain reaction (PCR)-based DNA sequencing technique targeting internal transcribed spacer (ITS) region. **Curr. Eye Res.**, vol. 33, p. 139-147, 2008.
- BARRET, A. J. Proteolytic enzymes: nomenclature and classification. In: BEYNON, R.; BOND, J. S. (ed) **Proteolytic enzymes – a practical approach**. 2nd. ed., New York: Oxford University Press, 2001, p. 1-22.
- BARRETEAU, H.; DELATTRE, C.; MICHAUD, P. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. **Food Technol. Biotechnol.**, vol. 44, n. 3, p. 323–333, 2006.
- BATISTA, F. A. S. et al. Doenças e pragas da mamoneira (*Ricinus communis* L.) e seu controle. **Circular técnica, 21**, Embrapa-Algodão, 1996. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/269442>>. Acesso em: 29 mar. 2013.
- BCC RESEARCH. **Report BIO030G - Global markets for enzymes in industrial applications**, March 2012. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-markets-bio030g.html>>. Acesso em 17 fev. 2013.

- BEAS-FERNÁNDEZ, R. et al. Characterization of Mexican and non-Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on morphological characteristics, pathogenicity on bean seeds and endoglucanase genes. **J. Plant. Pathol.**, vol. 88, n. 1, p. 51-58, 2006.
- BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**, 4th. rev. ext. ed., Berlin: Springer, p. 58-62, 2009.
- BELTRÃO, N. E. M. et al. Enfoque agrometeorológico para cultura da mamoneira. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Circular Técnica, n. 120, p. 1-13, 2008.
- BIANCHI, A.; BIANCHI, G. Surface lipid composition of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. **Biochem. Syst. Ecol.**, vol. 18, n. 7/8, p. 533-537, 1990.
- BOKOR, P. *Macrophomina phaseolina* causing a charcoal rot of sunflower through Slovakia. Bratislava: **Biologia**, vol. 62, n. 2, p. 136-138, 2007.
- BROCCA, S. et al. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. **Protein Sci.**, vol. 12, n. 10, p. 2312–2319, 2003.
- BROWN, A. K.; KAUL, A.; VARLEY, J. Continuous foaming for protein recovery: Part II. Selective recovery of proteins from binary mixtures. **Biotechnol. Bioeng.**, vol. 62, n. 3, p. 291-300, 1999a.
- BROWN, A. K.; KAUL, A.; VARLEY, J. Continuous foaming for protein recovery: Part I. Recovery of  $\beta$ -casein. **Biotechnol. Bioeng.**, vol. 62, n. 3, p. 278-290, 1999b.
- BURAPATANA, V. et al. Effect of buffer and pH on detergent-assisted foam fractionation of cellulase. **Ind. Eng. Chem. Res.**, vol. 44, n. 14, p. 4968-4972, 2005.
- BURAPATANA, V.; PROKOP, A.; TANNER, R. D. A comparison of the activity reduction occurring in two detergent-assisted protein (cellulase and lysozyme) foam fractionation processes. **Sep. Sci. Technol.**, vol. 40, p. 2445–2461, 2005.
- BURGHOFF, B. Foam fractionation applications. **J. Biotechnol.**, vol. 161, p. 126-137, 2012.
- CABI - CENTRE FOR AGRICULTURAL BIOSCIENCE INTERNATIONAL. **Species Fungorum**. Disponível em: <  
<http://www.speciesfungorum.org/Names/SynSpecies.asp?RecordID=300023>>.  
Acesso em: 31 jan 2013
- CHAHINIAN, H et al. Kinetic properties of *Penicillium cyclopium* lipases studied with vinyl esters. *Lipids*, vol. 35, n. 8, p. 919-925, 2000.
- CHAHINIAN, H. et al. Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids*, vol. 37, n. 7, p. 653-662, 2002.
- CHAHINIAN, H.; SARDA, L. Distinction between esterases and lipases: comparative biochemical properties of sequence-related carboxylesterases. **Protein Pept. Lett.**, vol. 16, n. 10, p. 1149-1161, 2009.

- CHAI, J. et al. Effect of bubble velocity and pH step changes on the foam fractionation of sporamin. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 46, n. 7, p. 2868-2872, 1998.
- CHANDRASEKARAN, M.; KUMAR, S. R. Marine microbial enzymes. In: Encyclopedia of life support systems (EOLSS) developed under the auspices of the UNESCO. **Biotechnology**, Vol. IX. Oxford, UK: EOLSS, 2002. Disponível em: <<http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C17/E6-58-08-02.pdf>>. Acesso em 16 fev. 2013.
- CHARM, S. E. et al. The separation and purification of enzymes through foaming. **Anal. Biochem.**, vol. 15, p. 498-508, 1996.
- CHERRY, J. et al. Developing an objective function to characterize the tradeoffs in salting out and the foam and droplet fractionation processes. **Braz. J. Chem. Eng.**, vol. 17, n. 2, jun. 2000. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-66322000000200011&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322000000200011&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 17 mar. 2013.
- CLARK, D. C. Application of state-of-the-art fluorescence and interferometric techniques to study coalescence in food dispersions. In: GAONKAR, A. G. (ed.), **Characterization of food: emerging methods**, Amsterdam: Elsevier, p. 23-57, 1995.
- CLARKSON, J. R.; CUI, Z. F.; DARTON, R. C. Protein denaturation in foam. II. Surface activity and conformational change. **J. Colloid Interface Sci.**, vol. 215, p. 333–338, 1999.
- COLEN, G.; JUNQUEIRA, R. G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, vol. 22, p. 881-885, 2006.
- COLLARES, D. G.; CHIES, V. MDA e Embrapa debatem produção de mamona no Brasil. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)/Imprensa/Notícias**, 09/10/2012. Disponível em <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2012/outubro/2a-semana/mda-e-embrapa-debatem-producao-de-mamona-no-brasil/>>. Acesso em: 01 fev. 2013.
- COMMÉNIL, P. et al. Molecular characterization of a lipase induced in *Botrytis cinerea* by components of grape berry cuticle. **Physiol. Molec. Plant Pathol.**, vol. 55, p. 37-43, 1999.
- COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Rev./Molec. Cell Biol.**, vol. 6, p. 850-861, 2005.
- COSTA, V. E. U.; DE AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Quim. Nova**, vol. 22, n. 6, p. 863-873, 1999.
- CROUS, P. W. et al. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Stud. Mycol.**, vol. 55, p. 235-253, 2006.

- DAMODARAN, S. Protein-stabilized foams and emulsions. In: DAMODARAN, S.; PARAF, A. (ed.) **Food proteins and their applications**, New York, NY: Dekker, p. 57-109, 1997.
- DAS, I. K.; FAKRUDIN, B.; ARORA, D. K. RAPD cluster analysis and chlorate sensitivity of some Indian isolates of *Macrophomina phaseolina* from sorghum and their relationships with pathogenicity. **Microbiol. Res.**, vol. 163, p. 215-224, 2008.
- DE LUCENA, S. L.; MIRANDA, E. A.; SANTANA, C. C. The effect of external reflux on the foam fractionation of proteins. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, vol. 57-58, p. 57-65, 1996.
- DOS PRAZERES, J. N. et al. Recovery of extracellular alkaline lipases of *Fusarium* spec. by foam fractionation. **Fresenius Environ.Bull.**, vol. 16, n. 11b, p. 1-6, 2007.
- EDRAKI, V.; BANIHASHEMI, Z. Phenotypic diversity among isolates of *Macrophomina phaseolina* and its relation to pathogenicity. **Iran. J. Plant. Pathol.**, vol. 46, n. 4, p. 93-100, 2010.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture**. Disponível em: <[http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/new\\_allViewGenBank.cfm?thisName=Macrophomina%20phaseolina&organismtype=Fungus&CFID=83452&CFTOKEN=983d62a385776558-E3B89C2C-90CE-F9F3-F90326F1E089AB43](http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/new_allViewGenBank.cfm?thisName=Macrophomina%20phaseolina&organismtype=Fungus&CFID=83452&CFTOKEN=983d62a385776558-E3B89C2C-90CE-F9F3-F90326F1E089AB43)>. Acesso em: 01 fev. 2013.
- FERNANDES, C F.; SOUZA, F. F.; RAMALHO, A. R. Doenças do Feijoeiro comum em Rondônia. **Recomendações técnicas, 93**, Embrapa-Rondônia, jul. 2005. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/859551>>. Acesso em: 29 mar. 2013.
- FERNANDES, L. P. et al. Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. **Rev. Eletr. Farm.**, vol. IV, n. 1, p. 43-51, 2007.
- FOJAN, P. et al. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. **Biochimie**, vol. 82, p. 1033-1041, 2000.
- GE Healthcare Life Sciences/Products. **Gel filtration – Principles and methods**. 2010a. Disponível em: <<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-br/products/chromatography>>. Acesso em 03 mar. 2013.
- GE Healthcare Life Sciences/Products. **Hydrophobic interaction and reversed phased chromatography – Principles and methods**. 2006. Disponível em: <<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-br/products/chromatography>>. Acesso em 03 mar. 2013.
- GE Healthcare Life Sciences/Products. **Hydrophobic interaction chromatography**. Disponível em: <<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSc>>

iences-br/products/hydrophobic-interaction-chromatography-hic/ >. Acesso em: 03 mar. 2013.

- GE Healthcare Life Sciences/Products. **Strategies for protein purification - Handbook**. 2010b. Disponível em: <<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-br/products/chromatography>>. Acesso em 03 mar. 2013.
- GERKEN, B. M. et al. Effective enrichment and recovery of laccase C using continuous foam fractionation. **Sep. Purif. Technol.**, vol. 49, p. 291-294, 2006.
- GOMES, E. et al. Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* A 1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A 13.37. *Braz. J. Microbiol.*, vol. 36, p. 75-82, 2005.
- GUERRERO, R. T.; SILVEIRA, R. M. B. **Glossário ilustrado de fungos: termos e conceitos aplicados à micologia**. 2. ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 2003.
- GUMMADI, S.N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases - a review. **Process Biochem.**, vol. 38, p. 987-996, 2003.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, vol. 64, p. 763–781, 2004.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 39, p. 235-251, 2006.
- HASEGAWA, T. et al. Subcutaneous granuloma associated with *Macrophomina* species infection in a cat. **Vet. Rec.**, vol. 156, p. 23-24, Jan. 2005.
- HEREDIA, A. Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. **Biochim. Biophys. Acta**, vol. 1620, p. 1-7, 2003.
- HIL, S. L. et al. Pullulanase: role in starch hydrolysis and potential industrial applications. **Enzym Res.**, vol. 2012, article ID 921362, 14 p., doi:10.1155/2012/921362, 2012. Acesso em 20 fev. 2013.
- INDEXMUNDI. **Soja Preço Mensal**. Disponível em: <<http://www.indexmundi.com/pt/pre%E7os-de-mercado/?mercadoria=soja&meses=300>>. Acesso em 28 mar. 2013.
- INVITROGEN. **Collagenase**. Jun., 2004. Disponível em: <<http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/3743%20collagenase.pdf>>. Acesso em 21 fev. 2013.
- ISLAM, S. et al. Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC Genomics**, vol. 13, p. 493, 2012.
- IUBMB – INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. **Enzyme nomenclature**. 2013a. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em 18 fev. 2013.

- IUBMB – INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. **EC 3. Introduction**. 2013b. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/intro.html#EC34>>. Acesso em 18 fev. 2013.
- JACOB, L. R. Hydrophobic interaction chromatography. In: KASTNER, M. (ed.) **Protein liquid chromatography**, 1. ed., Amsterdam: Elsevier, p. 235-269, 1999.
- JANA, T.; SHARMA, T. R.; SINGH, N. K. SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. **Mycol. Res.**, vol. 109, n. 1, p. 81-86, 2005.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochem.**, vol. 40, p. 2931-2944, 2005.
- KENNEDY, R. M. Hydrophobic chromatography. In: Deutscher, M. (ed.) **Guide to protein purification**. San Diego, CA: Academic Press, p. 339-343, 1990.
- KHALIKOVA, E.; SUSI, P.; KORPELA, T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. **Microb. Molec. Biol. Rev.**, vol. 69, n. 2, p. 306-325, 2005.
- KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Curr. Opin. Biotechnol.**, vol. 13, p. 345–351, 2002.
- KOI WATER GARDEN. 2013. Disponível em: <<http://www.koicarp.org.uk/fraction.htm>>. Acesso em 11 mar. 2013.
- KONCEPT ANALYTICS. **Global industrial enzymes market: an analysis**. 2010. Disponível em: <[http://www.researchandmarkets.com/reports/1417771/global\\_industrial\\_enzymes\\_market\\_an\\_analysis](http://www.researchandmarkets.com/reports/1417771/global_industrial_enzymes_market_an_analysis)>. Acesso em 17 fev. 2013.
- KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 53, vol. 1, p. 211-213, Jan. 1987.
- KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial cellulases and their industrial applications. **Enzyme Res.**, vol. 2011, article ID 280696, 2011, 10 p. doi:10.4061/2011/280696, 2011.
- LI, A. et al. Inheritance of strain instability (sectoring) in the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 60, n. 7, p. 2384-2388, 1994.
- LI, S. et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Comput. Struct. Biotechnol. J.**, vol. 2, n. 3, Sept. 2012, e201209017, doi: <http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201209017>. Acesso em 20 fev. 2013.
- LINKE, D. et al. Foam fractionation of exo-lipases from a growing fungus (*Pleurotus sapidus*). **Lipids**, vol. 40, n. 3, p. 323-327, 2005.

- LINKE, D. et al. Laccase isolation by foam fractionation - new prospects of an old process. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 40, p. 273-277, 2007.
- LINKE, D. et al. Separation of extracellular esterases from pellet cultures of the Basidiomycete *Pleurotus sapidus* by foam fractionation. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, vol. 86, p. 437-444, 2009.
- LINKE, D.; BERGER, R. G. Foaming of proteins: New prospects for enzyme purification processes. **J. Biotechnol.**, vol. 152, 125-131, 2011.
- LOCKWOOD, C. E.; BUMMER, P. M.; JAY, M. Purification of proteins using foam fractionation. **Pharm. Res.**, vol. 14, n. 11, p. 1511-1515, 1997.
- LOHA, V. et al. Preserving the activity of cellulose in a batch foam fractionation process. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, vol. 77-79, p. 701-712, 1999.
- LOHA, V.; TANNER, R. D.; PROKOP, A. The effect of pectinase on the bubble fractionation of invertase from  $\alpha$ -amylase. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, vol. 63-65, p. 395-408, 1997.
- LOWRY, O. H. et al. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, vol. 193, p. 265-275, Nov. 1951.
- MANSFELD, J. Metalloproteases. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. (ed) **Industrial enzymes: structure, function and applications**. Dordrecht: Springer, p. 221-242, 2007.
- MARTEL, M. B. et al. Purification and characterization of a glucoamylase secreted by the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Can. J. Microb.**, vol. 48, p. 212-218, 2002.
- MAYEK PÉREZ, N.; CASTAÑEDA, C. L.; GALLEGOS, J. A. A. Variación en características culturales *in vitro* de aislamientos de *Macrophomina phaseolina* y su virulencia en frijol. **Agrociencia**, vol. 31, n. 2 (abr.-jun.), p. 187-195, 1997.
- MERZ, J. et al. Purification and identification of a novel cutinase from *Coprinopsis cinerea* by adsorptive bubble separation. **Sep. Purif. Technol.**, vol. 69, p. 57-62, 2009.
- MONGA D, Raj S Root rot disease of cotton and its management. **Technical Bulletin No. 3**, Nagpur, India: Central Institute of Cotton Research, p. 1-7, 2000. Disponível em: < [http://www.cicr.org.in/pdf/rootrot\\_disease.pdf](http://www.cicr.org.in/pdf/rootrot_disease.pdf)>. Acesso em: 29 jan. 2013.
- MUKHOPADHYAY, G.; KHANAM, J.; NANDA, A. Protein removal from whey waste by foam fractionation in a batch process. **Sep. Sci. Technol.**, vol. 45, n. 9, p. 1331-1339, 2010.
- MURRAY, B. S. et al. Disproportionation kinetics of air bubbles stabilized by food proteins and nanoparticles. In: DICKINSON, E. **Food Colloids: interactions, microstructure and processing**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, p. 259-272, 2005.

- MUSTRANTA, A.; FORSSELL, P.; POUTANEN, K. Comparison of lipases and phospholipases in the hydrolysis of phospholipids. **Process Biochem.**, vol. 30, n. 5, p. 393-401, 1995.
- NFOR, B. K. et al. Design strategies for integrated protein purification processes: challenges, progress and outlook. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, vol. 83, p. 124-132, 2008.
- NINI, L. et al. Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. **Biochim. Biophys. Acta**, vol. 1534, p. 34-44, 2001.
- NYVALL, R. F. **Field crop diseases**. 3rd. ed. Ames: Iowa State University Press, p. 407, 1999.
- ONILUDE, A. A.; OSO, B. A. Effect of fungal enzyme mixture supplementation of various fibre-containing diets fed to broiler chicks 1: performance and carcass characteristics. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, vol. 15, p. 309-314, 1999.
- OSBORN H. T.; AKOH, C. C. Structured lipids - novel fats with medical, nutraceutical, and food applications. **Compr. Ver. Food Sci. Food Saf.**, vol. 1, n. 3, p. 110-120, 2002.
- PASTORE, G. M. A aplicação de enzimas na indústria de alimentos. In: **Workshop: As enzimas industriais na produção de alimentos: passado, presente e perspectivas futuras**. Brasília, 06 maio 2002. Disponível em: <<http://www.anbio.org.br/eventos/worksh43.htm>>. Acesso em: 03 fev. 2013.
- PERALTA, R. M. Procedimentos de isolamento e fracionamento de proteínas. In: BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. (org.) **Métodos de laboratório em bioquímica**. Barueri, SP: Manole, p. 193-226, 2003.
- PERNA, R. F. Fracionamento de surfactina em coluna de bolhas e espuma. Dissertação submetida à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Fev., 2010. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000477648&opt=4>>. Acesso em: 16 mar. 2013.
- PERRY, R. H.; CHILTON, C. H. **Chemical Engineer's Handbook**, 5th. ed., Chap. 17, New York: McGraw-Hill, 29-34, 1973.
- PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chem. Phys. Lipids**, vol. 93, p. 67-80, 1998.
- POLTRINIERI, L. S.; SILVA, J. F. A. F.; OLIVEIRA, A. F. F. Controle de *Macrophomina phaseolina* através da cobertura morta do solo associada ao tratamento químico de sementes. **Comunicado técnico, 68**, Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental, Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária, mai. 1992. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/381248/1/CPATUComTec68.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2013.



- PRABHU, H. V. **Variability and management of charcoal rot of sorghum caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.** Thesis submitted to the University of Agricultural Sciences, Dharwad, India, as partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Philosophy in Plant Pathology. Nov. 2009. Disponível em: <http://etd.uasd.edu/ft/th9979.pdf>>. Acesso em: 05 fev. 2013.
- PRZYBYCIEN, T. M., PUJAR, N. S.; STEELE, L. M. Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. **Curr. Opin. Biotechnol.**, vol. 15, p. 469–478, 2004.
- RADHA, K. The enzymic activity of *Macrophomina phaseoli*, (Maubl.), Ashby. **Proceedings: Plant Sci.**, vol. 38, n. 6, p. 231-234, 1953.
- RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.**, vol. 62, n. 3, p. 597-635, Sept. 1998.
- RAO, N. N. et al. Continuous biocatalytic processes. **Org. Process Res. Dev.**, vol. 13, p. 607–616, 2009.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia de las plantas.** Vol. 2, p. 384-397, 1992.
- RITO-PALOMARES, M. Bioseparation: the limiting step in bioprocess development. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, vol. 83, p. 115–116, 2008.
- ROCHE Applied Science. **Tissue Dissociation (Collagenase)**, Links to online protocols, 2013. Disponível em: <[https://www.roche-applied-science.com/sis/collagenase/index.jsp?id=col\\_070001](https://www.roche-applied-science.com/sis/collagenase/index.jsp?id=col_070001)>. Acesso em 21 fev. 2013.
- ROSA, P. T. V. **Fracionamento de proteínas e outros tensioativos em colunas de bolhas e espuma.** Tese submetida à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Mar., 1996. Disponível em:< <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls00011274>>. Acesso em: 16 mar. 2013.
- ROSS, S. Foams. In: KIRK, R. E.; OTHMER, D. F. (ed.) **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, 3rd. ed., New York, NY: Wiley, vol. 11, p. 127-145, 1980.
- ROY, P. K; ROY, U.; VORA, V. C. Hydrolysis of wheat bran, rice bran and jute powder by immobilized enzymes from *Macrophomina phaseolina*. **World J. Microb. Biotechnol.**, vol. 9, n. 2, p. 164-167, 1993.
- ROY, U.; VORA, V. C. Purification and properties of a carboxymethylcellulase from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Indian J. Biochem. Biophys.**, vol. 26, n. 4, p. 243-248, Aug. 1989.
- RYAN, M. J. et al. Phenotypic degeneration occurs during sector formation in *Metarhizium anisopliae*. **J. Appl. Microbiol.**, vol. 93, p. 163–168, 2002.

- SAHIN, S.; SUMNU, S. G. **Physical properties of foods**. New York, NY: Springer, p. 229-257, 2006.
- SALES JUNIOR et al. Ervas daninhas como hospedeiras alternativas de patógenos causadores do colapso do meloeiro. **Rev. Ciên. Agron.**, v. 43, n. 1, p. 195-198, jan-mar, 2012.
- SANZ, Y. Aminopeptidases. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. (ed) **Industrial enzymes: structure, function and applications**. Dordrecht: Springer, p. 243-262, 2007.
- SARAIVA, O. F.; LEITE, R. M. V. B. de C.; DE CASTRO, C. (ed.) **Ata da XXX Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**. Embrapa Soja, Londrina, Paraná, 350 p., 2009. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/download/publicacao/doc310.pdf>>. Acesso em 29 jan. 2013.
- SAXENA, R. K. et al. Purification strategies for microbial lipases. **J. Microbiol. Methods**, vol. 52, p. 1-18, 2003.
- SCHINKE, C.; GERMANI, J.C. Recovery of extracellular lipolytic enzymes from *Macrophomina phaseolina* by foam fractionation with air. **Enzyme Research**, 2013 (no prelo).
- SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angew. Chem. Int. Ed.**, vol. 37, p. 1608-1633, 1998.
- SENANAYAKE, S. P. J. N.; SHAHIDI, F. Modification of fats and oils via chemical and enzymatic methods. In: SHAHIDI, F. (ed). **Bailey's industrial oil and fat products**. 6th. ed., vol. 1, Hoboken, NJ: Wiley-Interscience, p. 555-584, 2005.
- SERGEEVA, V. et al. First report of *Macrophomina phaseolina* on olives (*Olea europaea*) in Australia. **Australasian Plant Pathol.**, vol. 34, p. 273-274, 2005.
- SHAHIDI, F.; SENANAYAKE, S. P. J. N. Modificación de lípidos. In: BLOCK, J. M.; BARRERA-ARELLANO, D. (ed.), **Temas selectos en aceites y grasas**. São Paulo, SP: Bluchner, vol. I, p. 265-298, 2009.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and application of lipases. **Biotechnol. Adv.**, vol. 19, p. 627-662, 2001.
- SOHAIL, M. et al. Distribution of hydrolytic enzymes among native fungi: *Aspergillus*, the predominant genus of hydrolase producer. **Pak. J. Bot.**, vol. 41, n. 5, p. 2567-2582, 2009.
- SRINIVASAN, A. et al. Cutaneous infection caused by *Macrophomina phaseolina* in a child with acute myeloid leukemia. **J. Clin. Microbiol.**, vol. 47, no. 6, p. 1969-1972, Jun. 2009.
- SUGIYAMA, Y.; POLULYAKH N.; SHIMIZU, T. Identification of transmembrane protein functions by binary topology patterns. **Protein Eng.**, vol. 16, n. 7, p. 479-488, 2003.

- TANAKA, K. et al. Purification of human albumin by the combination of the method of Cohn with liquid chromatography. **Braz. J. Medical Biol. Res.**, vol. 31, n. 11, p. 1383-1388.
- UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quim. Nova**, vol. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.
- UNDERKOFER, L. A.; BARTON, R. R.; RENNERT, S. S. Production of microbial enzymes and their applications. **Appl. Microbiol.**, vol. 6, n. 3, p. 212-221, 1958.
- URAZEE, F.; NARSIMHAN, G. Effects of kinetics of adsorption and coalescence on continuous foam concentration of proteins: comparison of experimental results with model predictions. **Biotechnol. Bioeng.**, vol. 51, n. 4, p. 384-398, Aug. 20, 1996.
- URAZEE, F.; NARSIMHAN, G. Foam fractionation of proteins and enzymes. II. Performance and modeling. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 12, p. 315-316, April 1990.
- USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, **Agricultural Research service, Fungal databases**. Disponível em: < <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/fungushost/FungusHost.cfm>>. Acesso em: 29 mar. 2013.
- USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, **Production, Supply and Distribution Online**. Disponível em:< <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acesso em 13 mar. 2013.
- VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochem. (Moscow)**, vol. 69, n. 11, p. 1305-1309, 2004.
- VAN BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Curr. Opin. Biotechnol.**, vol. 13, p. 338-344, 2002.
- VINZANT, T. B. et al. Fingerprinting *Trichoderma reesei* hydrolases in a commercial cellulase preparation. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, vol. 91-93, p. 99-107, 2001.
- VOIGT, C. A.; SCHÄFER, W.; SALOMON, S. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. **The Plant J.**, vol. 42, p. 364-375, 2005.
- VORDERWÜLBECKE, T.; KIESLICH, K.; ERDMANNT, H. Comparison of lipases by different assays. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 14, p. 631-639, Aug. 1992.
- WANG, C.; BUTT, T. M.; ST. LEGER, R. J. Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. **Microbiology**, vol.151, 3223-3236, 2005.
- WANG, H. Y.; JONES, R. W. A unique endoglucanase-encoding gene cloned from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Appl. Environ. Microb.**, vol. 61, n. 5, p. 2004-2006, 1995.

- WANG, H. Y.; JONES, R. W. Properties of the *Macrophomina phaseolina* endoglucanase (EGL 1) gene product in bacterial and yeast expression systems. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, vol. 81, n. 3, p. 153-160, 1999.
- WANG, Z; NARSIMHAN, G. Model for Plateau border drainage of power-law fluid with mobile interface and its application to foam drainage. **J. Colloid Interface Sci.**, vol. 300, p. 327–337, Graphical abstract, 2006.
- WALKER, J. Protein structure, purification and characterisation. In: WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and techniques of practical biochemistry**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 312-356, 2000.
- WRATHER J. A. et al. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994. **Plant Disease**, vol. 81, n. 1, p. 107-110, Jan. 1997.
- WRATHER J. A. et al. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. **Can. J. Plant Pathol.**, vol. 23, n. 2, p. 115-121, June 2001.
- WRATHER, J. A.; KOENNING, S. R. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005. **J. Nemat.**, vol. 38, n. 2, p. 173-180, 2006.
- ZHANG, Q. **Collection of Trichoderma reesei cellulase by foaming**. Dissertation presented to the Graduate Faculty of the University of Akron, in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy, Dec. 2007. Disponível em:  
<[http://etd.ohiolink.edu/view.cgi?acc\\_num=akron1195069754](http://etd.ohiolink.edu/view.cgi?acc_num=akron1195069754)>. Acesso em 11 mar. 2013.
- ZHANG, C. et al. Lysozyme purification from tobacco extract by polyelectrolyte precipitation. **J. Chrom. A**, vol. 1069, n. 1, p. 107-112, 2005.

## CAPÍTULO III – PUBLICAÇÕES

Neste Capítulo são apresentados o artigo publicado, bem como o aceite para publicação em periódico, resultantes do presente trabalho de pesquisa.

### 1. Artigo publicado no International Microbiology

#### **Screening Brazilian *Macrophomina phaseolina* isolates for alkaline lipases and other extracellular hydrolases**

Claudia Schinke,\* José Carlos Germani

Department of Raw Materials Production, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Received 27 December 2011

\*Corresponding author: C. Schinke  
Laboratório de Tecnologia Bioquímica. Faculdade de Farmácia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Av. Ipiranga 2752 sala 707  
Porto Alegre, RS, CEP 90610-000, Brazil  
Tel./fax +55-5133085354  
E-mail: claudia\_schinke@yahoo.com.br

**Running title:** Lipases from *M. phaseolina*

**Summary.** *Macrophomina phaseolina*, phylum Ascomycota, is a phytopathogenic fungus distributed worldwide in hot dry areas. There are few studies on its secreted lipases and none on its colony radial growth rate, which indicates ability to use nutrients to grow, on media other than potato-dextrose agar. Thirteen *M. phaseolina* collected in different Brazilian regions were screened for fast growing isolates that produce hydrolases of industrial interest, especially alkaline lipases. Hydrolases detection and growth rate determination were done on citric pectin, gelatin, casein, soluble starch, and olive oil as substrate. Ten isolates were active on all substrates. Most common enzymes were pectinases, amylases, and lipases. Growth rate on pectin was significantly higher ( $P < 0.05$ ), and rates on the different media allowed the selection of CMM 2105, CMM 1091 and PEL as the fastest growing isolates. Lipase activity of the cultivation broths of four isolates grown on olive oil was followed for four days. Specific lipolytic activity of isolate PEL was significantly higher at 96 h ( $130 \text{ mU mg protein}^{-1}$ ). The broth was active at 37 °C, pH 8, indicating potential use of its lipases in mild alkaline detergents. There was a strong and positive correlation (0.86) between radial growth rate and specific lipolytic activity.

**Keywords:** pectinases · amylases · proteases · lipolytic activity · radial growth rate

## Introduction

Enzymes are an important group of biological products used in several processes in the food industry and in the environmental and industrial biotechnological areas [23]. Enzymes have many advantages over chemical catalysts. They function under relatively mild conditions of temperature, pH, and pressure; are specific and some are stereoselective. In addition, they produce no unwanted by-products [40]. Lipases are of especial interest because of their many applications in oleochemistry, organic synthesis, detergent industry, and nutrition [30]. However, the single biggest market for them is in detergent formulations [27]. Fungi are excellent sources of enzymes as they produce these biocatalysts in great variety [8,31].

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. [<http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases>, accessed Feb. 24, 2012] is a phytopathogenic filamentous fungus belonging to the anamorphic Ascomycota, *Botryosphaeriaceae* family [5,10], producing both sclerotia and pycnidia. It is responsible for the plant disease called charcoal rot of roots and stems. There are also reports of the fungus causing human ocular infection, skin infection in an immunocompromised child, and granuloma in a cat [6,14,37]. It is widely distributed in tropical regions in areas subjected to water stress, where it infects hundreds of different hosts [36] causing great economic loss [34]. In Brazil, *M. phaseolina* is found from the Northeastern region, where climate is mostly hot and dry, to the South region, with high humidity and temperatures ranging from 30 °C in the summer to 5 °C in winter. The microorganism penetrates the host tissues through mechanical pressure exerted by the spore germ tube and the sclerotia hyphae, as well as through dissolution of the cell wall caused by the enzymes it secretes [4].

The plant cell wall is a complex structure of polymers that surrounds the cell. To degrade this wall and the cell membrane, the microorganism produces cellulolytic, hemicellulolytic, pectolytic, and proteolytic extracellular enzymes [2], as well as lipases, capable of breaking down each of the main polymeric components. Studies on extracellular enzymes produced by *M. phaseolina* are few, and the most recent ones are almost exclusively on cellulases and endoglucanases [1,7,29,41–43]. The colony radial growth rate indicates how well a fungus is able to use the substrate to grow by secreting the necessary enzymes and thus enabling nutrients uptake for fungal physiology and cell multiplication. Only one study could be found in which the

relative growth rate of this phytopathogen on potato-dextrose agar (PDA) [18] is given in detail, but no studies were found on radial growth rates on other substrates. There are some works on the lipolytic activity of *M. phaseolina* [2,16,28], usually with one or two isolates.

The objective of the present work was to screen wild-type *M. phaseolina* collected in Brazil for fast growing isolates that produce hydrolases of industrial interest, and especially to select those producing alkaline lipases in high amounts.

## **Material and methods**

**Equipment and reagents.** Reagents and cultivation media were of the purest grade available, bought from Himedia (India), Merck (Germany), Vetec and Nuclear (Brazil). Extra-virgin olive oil was of commercial grade. A Minisart (Sartorius) filter, porosity 0.2 µm, was used for filter sterilizing. The rotatory shaker was from Oxylab (Brazil), and the spectrophotometer was a Shimadzu UV Mini-1240.

***Macrophomina phaseolina* isolates.** Isolates were provided by the Phytopathogenic Fungi Culture Collection Prof. Maria Menezes of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPe) – isolates CMM 527, CMM 932, CMM 979, CMM 1048, CMM 1091, CMM 2100, CMM 2105, collected in the northeastern region of Brazil; the Fungi Collection Mário Barreto Figueiredo of the Biological Institute of the Department of Agriculture and Supply of the State of São Paulo (IB-SP) – isolates MMBF 564, MMBF 16–98, collected in the northeastern region, and MMBF 808, MMBF 04–10, collected in the southeastern region; the Phytosanitary Department of the Federal University of Pelotas (UFPe) – isolate PEL, collected in the southern region; and the Phytopathology Department of the Federal University of Viçosa – isolate AJAM, collected in the southeastern region.

**Isolates maintenance.** Isolates were cultivated on potato dextrose agar (PDA) at 24±1 °C until colonies reached approximately 2/3 of the area of the Petri dishes. Discs of 0.5 cm in diameter were collected from the active growing region of the



colonies and kept in sterile distilled water, pH 6.5, at 6–8 °C, as stock for future inoculations.

**Production of extracellular hydrolases.** Pontecorvo's minimal medium agar in Petri dishes [24], pH 6.8, with 0.2 % glucose concentration [33], added of 1 % (w/v) citric pectin, 4 % (w/v) gelatin (sodium nitrate reduced to 3 mM), or 1 % (w/v) soluble starch, was used to detect pectinases, proteases on gelatin, and amylases, respectively. After the incubation period, hydrolysis of the substrates was detected by covering the plate with 1 % (w/v) hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) [13] for pectinases, saturated solution of ammonium sulfate for proteases, or 1 % Lugol solution for amylases. A clear halo around the colony, on an opaque surrounding, indicated pectin or gelatin hydrolysis. A reddish or yellowish halo around the colony on a dark background indicated starch hydrolysis.

Extracellular proteolytic enzymes on casein were detected with skim milk agar [19]. After incubation, a transparent halo around the colony on an opaque background indicated casein hydrolysis. Lipases were detected with sterilized rhodamine B agar [39] added of previously filter-sterilized olive oil at a 1 % (v/v) concentration. A yellow-orange color around the colony under 350 nm UV light indicated production of lipases by the microorganism.

Each hydrolase assay was done in triplicate per isolate, by inoculating a mycelium disc in the center of each 9-cm Petri dish. Plates were incubated at 30 °C in the dark for variable periods, until colonies reached 3/5 to 3/4 of the plate area.

**Colony radial growth rate.** To determine the growth rate, media and conditions above described, as well as PDA pH 6.8, were used. All assays were done in triplicate. Readings of colony size were done at regular intervals by measuring the colony diameter on two axes at a right angle over the inoculation point with a Vernier caliper. Measurements were done until colonies reached the sides of the plate. Radial growth rate on PDA was determined in 9-cm diameter plates with all isolates, and in 20-cm diameter plates with isolates MMBF 04-10, MMBF 808, PEL, and CMM

2105. The radial growth rate (mm/h), expressed by the angle of the linear portion of the regression line, was calculated by using the radius of the colony versus incubation time.

**Lipolytic activity.** Erlenmeyer flasks of 250 ml, containing 100 ml of a minimal salts broth [9] pH 6.8, added of 1 % (v/v) previously filter-sterilized olive oil, were inoculated with three discs of mycelium of isolates MMBF 04-10, CMM 2105, PEL, and MMBF 808, one flask per isolate. Flasks were incubated at 30 °C at 160 rpm in a rotatory shaker. Five-milliliters samples were collected at every 24 hours for four days, filtered through Whatmann paper, and frozen at -17 °C until analysis. Lipolytic activity of the cultivation broths was assayed by using 4-nitrophenyl palmitate (pNPP) as substrate [22] in pH 8 Tris-HCl buffer, incubated at 37 °C ( $\epsilon = 13,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) for 15 min. Absorbance was read at 410 nm by using heat inactivated cultivation broth as blank. One unit (U) of lipolytic activity is defined as the amount of enzyme that liberates one  $\mu\text{mol}$  of 4-nitrophenol (pNP) per minute per ml of cultivation broth. Protein content of the samples was determined according to Lowry's method, and the specific lipolytic activity ( $\text{U mg protein}^{-1}$ ) was calculated.

**Statistical analysis. Assistat.** Statistical Assistance software was used for ANOVA, Tukey test and Scott-Knott test [<http://www.assistat.com/indexp.html>].

## Results and Discussion

**Production of extracellular hydrolases.** Table 1 shows hydrolases produced by each isolate. The positive and negative signs indicate production or lack of detection, respectively, of enzymes hydrolyzing each substrate. All thirteen isolates hydrolyzed pectin. Pectin hydrolysis with enzymatic extracts of *M. phaseolina* has been evidenced earlier [26]. Pectinases have been also detected in another study with three isolates [3], one of which is more efficient in causing stem rot. Dhingra et al. [11] have shown the differentiated pectolytic and cellulolytic activity in vitro and in vivo between a virulent and an avirulent isolate. Maximum pectinase activity is

detected at 48 hours when this phytopathogen is grown in submerged cultivation [2], and the activity decreases rapidly after 96 hours. Yet, weak pectinase activity is found in *Macrophomina* sp. MS 139 [35].

TABLE 1
---------

All thirteen isolates secreted amylases. Onilude and Oso [21] have obtained amylases from *M. phaseolina* and have used them crude or partially purified in feed diet to improve weight gain of broiler chicken. Another study [35], testing for extracellular hydrolases in several fungi, has found no amylases in *Macrophomina* sp. MS 139. However, there is a report [12] of amylases in an isolate of this fungus showing good dextrinizing and saccharizing specific activities on carbon sources such as starch, flour from jackfruit seed, and rice flour.

In the present study, eleven isolates produced proteases able to hydrolyze gelatin. Proteases active on casein were also frequently detected, and these enzymes were not detected in only two (AJAM and MMBF 564) of the thirteen isolates. There are sparse references on proteases produced by *M. phaseolina*, and they also mention variability in their detection. Ahmad et al. [2] using two strains of this fungus have detected no proteolysis on casein either in solid medium in Petri dishes or in submerged culture. However, studying several fungi, Sohail et al. [35] have found proteolytic enzymes in mineral medium with casein in *Macrophomina* sp. MS 139 and concluded that the proteases are hydrolases common in filamentous fungi. Kakde and Chavan [15] have also noticed this fungus using casein as source of nitrogen.

When we used olive oil to induce lipase production, all isolates showed activity, except for AJAM, which showed very restricted growth and no lipolysis even after six days of cultivation. Other studies have also shown lipolytic enzymes produced by this pathogen. In an experiment comparing lipase production by *M. phaseolina* and *Phoma nebulosa* [28], the enzyme production depends on the culture medium used. In that work, *M. phaseolina* produces higher amounts of lipases, which are stimulated by the addition of sesame flour to the medium. Another research [38], studying the changes in moisture content, fatty acids, and proteins in peanuts caused by deterioration by *M. phaseolina*, has found a decrease in oil content as well as an

increase in free fatty acids, demonstrating the lipolytic action of this fungus on the seeds. In the above-mentioned study by Ahmad *et al.* [2], the two *M. phaseolina* isolates also show production of lipases.

Ten of the thirteen isolates showed hydrolytic activity on all substrates tested, and in contrast to some studies on filamentous fungus, proteases were the hydrolases less frequently detected in this work.

**Colony radial growth rate.** The radial growth rate (mm/h) of each isolate grown on the different media was calculated using the radius of the colony versus the incubation time. The overall radial growth rate of a medium was determined by taking the individual rates of the triplicates of the thirteen isolates on the same medium and calculating their mean (Table 2). The several culture media promoted two groups of growth rates, showing that *M. phaseolina* grew significantly better ( $P < 0.05$ ) on pectin and gelatin. Radial growth rates were quite variable among isolates grown on the same medium, and varied for the same isolate on the different culture media (Table 3). The linear correlation coefficient (Pearson's  $r$ ) of the regression lines remained between 0.99 and 0.83 for all media, except for gelatin ( $r = 0.75$ ).

TABLE 2
---------

TABLE 3
---------

Cultivated under the same conditions, isolates of *M. phaseolina* in the present study showed radial growth rates on PDA well above those determined by Mayek-Pérez *et al.* [18] with Mexican isolates from different hosts and different regions of the country. In that study, the rates range from 0.45 to 0.50 mm/h, and the authors relate the heterokaryotic nature of the mycelium of *M. phaseolina* to the variability of its morphological characteristics, development *in vitro*, and virulence. They also mention as source of variability the geographical origin of the isolate, type of host, time of cultivation and culture medium employed. Although isolate MMBF 04-10 showed the highest growth rate on PDA, other isolates grew faster on the several media. Of all substrates tested, pectin provided the highest growth rates, on which isolate CMM 1091 grew significantly faster ( $1.61 \pm 0.06$  mm/h,  $P < 0.05$ ). On starch, isolate CMM

2105 showed a significantly higher rate ( $P < 0.05$ ). Several isolates grew fast on gelatin, but not on casein, despite both being protein substrates, and casein accounted even for the lowest rates among all substrates. The filamentous fungi *Batrachochytrium dendrobatidis* [25] and *Aspergillus sydowii* [32] also show different growth patterns when cultivated either on gelatin or on casein, both developing higher mycelium mass in media containing casein. On olive oil, PEL, CMM 1091, and CMM 2105 showed significantly faster growth ( $P < 0.05$ ) compared to other isolates.

The variability in the production of the several extracellular hydrolases by *M. phaseolina*, as well as in the rate of radial growth on PDA reported in the present study, confirms the diversity of these features found by other authors. To our knowledge, this is the first report on *M. phaseolina* radial growth rates on media other than PDA.

High growth rate and production of a particular enzyme allow the selection of isolates with specific characteristics. CMM 1091 grew fast on all the substrates tested for the production of hydrolases, and isolates PEL and CMM 2105 grew quickly on most media, producing the corresponding hydrolase. Thus, CMM 1091, PEL, and CMM 2105 are isolates of choice for further research to access the potential industrial use of their enzymes.

**Lipolytic activity.** In order to verify the production of lipases by four isolates using olive oil as sole source of carbon, the lipolytic activity of their cultivation broths was tested against 4-nitrophenyl palmitate. Figure 1 shows the specific lipolytic activity (U mg protein<sup>-1</sup>) of isolates PEL, CMM 2105, MMBF 04-10, and MMBF 808 along four days of cultivation. Values represent the means and standard deviation of three determinations. The activities of PEL, CMM 2105, and MMBF 04-10 increased with cultivation time, reaching their maximums at 96 hours: PEL 130 mU mg protein<sup>-1</sup>, CMM 2105 110 mU mg protein<sup>-1</sup>, and MMBF 04-10 80 mU mg protein<sup>-1</sup>. Isolate PEL showed the highest activity throughout the cultivation period, whereas the activity of isolate MMBF 808 was minimal (2 mU mg protein<sup>-1</sup> in 96 hours). ANOVA and Tukey test ( $P < 0.05$ ) of the specific lipolytic activities of PEL, CMM 2105, and MMBF 04-10 indicated that they were significantly different, PEL being the highest.

## FIGURE 1

Ahmad et al. [2] have cultivated for 96 hours two strains of *M. phaseolina* in minimal salts medium with olive oil and determined the lipolytic activity of the broth at regular intervals. The activity of strain 1 reaches its peak at 24 hours, decreasing over time to its minimum at 96 hours, while strain 2 also shows peak activity at 24 hours, but only about 40 % of that of strain 1. Its activity then decreases at 48 hours, showing no further change until the end of the cultivation period. Kakde and Chavan [16] have cultivated an isolate of *M. phaseolina* for 25 days in submerged cultivation in minimal salts medium containing oil and tested the lipolytic activity of the broth every 5 days for 25 days. The activity increases throughout the period, reaching its maximum on the day 25. By the day 5, it already shows half the activity of the last day. Apart from the present work, we find no other studies that have used spectrophotometry to determine the lipolytic activity of *M. phaseolina*, and thus numerical results cannot be compared. However, from the shown above, it becomes clear that the incubation time necessary for *M. phaseolina* to reach peak lipolytic activity in submerged culture is quite variable depending on culture conditions and isolate.

Note that comparing radial growth rate on olive oil medium and specific lipolytic activity of the four isolates tested, both CMM 2105 and PEL showed high growth rates and produced the highest lipase activities. Growth rate and lipolytic activity have shown to be regulated by the cAMP/PKA (cyclic AMP-dependent Protein Kinase A) signaling pathway in other fungi. In a study by Ocampo et al. [20], a mutant of *Mucor circinelloides*, lacking the gene for one of the regulatory subunits of PKA (with high PKA activity), shows decrease in growth and alterations in germination rates, cell volume, germ tube length, and asexual sporulation. Klose et al. [17] have shown that cAMP/PKA signaling is responsible for regulating the morphological growth of *Ustilago maydis*, whether filamentous or budding, and that higher amounts of lipase are secreted in the presence of triglycerides only by strains showing filamentous growth. They suggest that cAMP signaling would be involved in the ability to use oils as carbon source and that the gene(s) encoding the lipase activity would be regulated by PKA. Findings in the present study suggest that this is also the case with *Macrophomina phaseolina* as the correlation coefficient between

radial growth rate on olive oil and lipolytic activity was strong and positive (0.86), indicating that a faster filamentous growth was associated with a higher production of lipolytic enzymes.

We can conclude that *Macrophomina phaseolina* produced extracellular pectinases, amylases, proteases, and lipases. The isolates, however, showed variability in the production of these enzymes, as some did not produce all the hydrolases tested, and proteases were less commonly detected on both gelatin and casein.

The determination of radial growth rates on different substrates, as well as the detection of the corresponding extracellular hydrolases, allowed selecting CMM 1091, CMM 2105, and PEL as fast-growing isolates of great diversity in the production of extracellular hydrolases of industrial interest. Our results suggest that, much like in some other fungi, in *M. phaseolina* there was a correlation between radial growth rate and lipolytic activity regulated by the cAMP/PKA pathway. Among the isolates tested, PEL produced the highest lipase activity, and the enzyme was active at 37 °C, pH 8, with potential use in mild alkaline detergents.

**Acknowledgements.** The authors thank the financial support from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, Ministry of Education, Brazil) in the form of a scholarship to C. Schinke. They also thank Igor Villela Marroni, the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), the Biological Institute of the Department of Agriculture and Food Supply of the State of São Paulo (IB-SP), the Federal University of Pelotas (UFPEl), and the Federal University of Viçosa for providing samples of *M. phaseolina*. Thanks are also due to Dr. Marco Antonio Z. Ayub and Dr. Adriano Brandelli from the Institute of Food Science and Technology of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brazil) for providing reagents and facilities.

**Competing interests.** None declared.

## References

1. Afouda L, Wolf G, Wydra K (2009) Development of a sensitive serological method for specific detection of latent infection of *Macrophomina phaseolina* in cowpea. J Phytopathol 157:15-23
2. Ahmad Y, Hameed A, Ghaffar A (2006) Enzymatic activity of fungal pathogens in corn. Pak J Bot 38:1305-1316
3. Ali MM, Sayem AZM, Alam S, Ishaque M (1969) Relationship of pectic enzyme of *Macrophomina phaseoli* with stem-rot disease and retting of jute. Mycopathologia 38:289-298
4. Ammon V, Wyllie TD, Brown Jr MF (1974) An ultrastructural investigation of pathological alterations induced by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in seedlings of soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. Physiol Plant Pathol 4:1-2
5. Arora P, Dilbaghi N, Chaudhury A (2012) Opportunistic invasive fungal pathogen *Macrophomina phaseolina* prognosis from immunocompromised humans to potential mitogenic RBL with an exceptional and novel antitumor and cytotoxic effect. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31:101-107
6. Bagyalakshmi R, Therese KL, Prasanna S, Madhavan HN (2008) Newer emerging pathogens of ocular non-sporulating molds (NSM) identified by polymerase chain reaction (PCR)-based DNA sequencing technique targeting internal transcribed spacer (ITS) region. Curr Eye Res 33:139-147
7. Beas-Fernández R, De Santiago-De Santiago A, Hernández-Delgado S, Mayek-Pérez N (2006) Characterization of Mexican and non-Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on morphological characteristics, pathogenicity on bean seeds and endoglucanase genes. J Plant Pathol 88:53-60
8. Bennett, JW (1998) Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. J Biotechnol 66:101-107
9. Colen G, Junqueira RG, Moraes-Santos T (2006) Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. World J Microbiol Biotechnol 22:881-885
10. Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ *et al.* (2006) Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. Stud in Mycol 55:235-253



11. Dhingra OD, Schneider RW, Sinclair JB (1974) Cellulolytic and pectolytic enzymes associated with virulent and avirulent isolates of *Macrophomina phaseolina* *in vitro* and in soybean seedlings. J Phytopathol 80:324-329
12. Fernandes LP, Ulhoa CJ, Asquieri ER, Monteiro VN (2007) Produção de amilases pelo fungo *Macrophomina phaseolina*. R Eletrônica da Farmácia 4:43-51 (In Portuguese)
13. Hadj-Taieb N, Ayadi M, Trigui S, Bouabdallah F, Gargouri A (2002) Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium ocitanis*. Enzyme Microb Technol 30:662-666
14. Hasegawa T, Yoshida Y, Kosuge J, et al. (2005) Subcutaneous granuloma associated with *Macrophomina* species infection in a cat. Vet Rec 156:23-24
15. Kakde RB, Chavan AM (2011) Effect of carbon, nitrogen, sulphur, phosphorus, antibiotic and vitamin sources on hydrolytic enzyme production by storage fungi. Recent Res Sci Technol 3:20-28
16. Kakde RB, Chavan AM (2011) Extracellular lipase enzyme production by seed-borne fungi under the influence of physical factors. Int J Biol 3:94-100
17. Klose J, de Sá MM, Kronstad JW (2004) Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. Mol Microbiol 52:823-835
18. Mayek-Pérez N, Castañeda CL, Gallegos JAA (1997) Variación en características culturales *in vitro* de aislamientos de *Macrophomina phaseolina* y su virulencia en frijol. Agrocienca 31:187-195 (In Spanish)
19. Medina P, Baresi L (2007) Rapid identification of gelatin and casein hydrolysis using TCA. J Microbiol Methods 69:391-393
20. Ocampo J, Fernandez Nuñez L, Silva F, Pereyra E, Moreno S, Garre V, Rossi S (2009) A sub-unit of protein kinase A regulates growth and differentiation in the fungus *Mucor circinelloides*. Eukaryot Cell 8:933-944
21. Onilude AA, Oso BA (1999) Effect of fungal enzyme mixture supplementation of various fibre-containing diets fed to broiler chicks 1: Performance and carcass characteristics. World J Microbiol Biotechnol 15:309-314
22. Ozcan B, Ozyilmaz G, Cokmus C, Caliskan M (2009) Characterization of extracellular esterase and lipase activities from five halophylic archeal strains. J Ind Microbiol Biotechnol 36:105-110

23. Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P (1999) Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr Sci* 77:149-162
24. Penariol MC, Monterio AC, Pitelli RA (2008) Crescimento e esporulação de *Bipolaris euphorbiae* cultivado sob diferentes condições nutricionais. *Ciência Rural* 38:1907-1913 (In Portuguese)
25. Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE (2004) Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96:9-15
26. Radha K (1953) The enzymic activity of *Macrophomina phaseoli* (Maubl.), Ashby. *Proceedings: Plant Sci* 38:231-234
27. Rathi P, Saxena RK, Gupta R (2001) A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochem* 37:187-192
28. Reddy AS, Reddy SM (1983) Lipase activity of two seed-borne fungi of sesamum (*Sesamum indicum* Linn.). *Folia Microbiol* 28:463-466
29. Roy PK, Roy U, Vora VC (1993) Hydrolysis of wheat bran, rice bran and jute powder by immobilized enzymes from *Macrophomina phaseolina*. *World J Microbiol Biotechnol* 9:164-167
30. Saxena RK, Sheoran A, Giri B, Sheba Davidson W (2003) Purification strategies for microbial lipases. *J Microbiol Methods* 52:1-18
31. Serrat M, Rodríguez O, Camacho M, Vallejo JA, Ageitos JM, Villa TG (2011) Influence of nutritional and environmental factors on ethanol and endopolygalacturonase co-production by *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011. *Int Microbiol* 14:41-49
32. Sharma AK, Sharma V, Saxena J (2011) Production of protease and growth characteristics of *Aspergillus sydowii*. *Nat Sci* 9:217-221
33. Silva JH, Monteiro RTR (2000) Degradação de xenobióticos por fungos filamentosos isolados de areia fenólica. *R Bras Ciência Solo* 24:669-674 (In Portuguese)
34. Smith GS, Carvil ON (1997) Field screening of commercial and experimental soybean cultivars for their reaction to *Macrophomina phaseolina*. *Plant Dis* 81:363-368
35. Sohail M, Naseeb S, Sherwani SK, Sultana S, Aftab S, Shahzad S, Ahmad A, Khan SA (2009) Distribution of hydrolytic enzymes among native fungi:

- Aspergillus* the pre-dominant genus of hydrolase producer. Pak J Bot 41:2567-2582
36. Songa W, Hillocks RJ, Mwangi'ombe AW, Buruchara R, Ronno WK (1997) Screening common bean accessions for resistance to charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) in Eastern Kenia. Exp Agric 33:459-468
  37. Srinivasan A, Wickes BL, Romanelli AM et al. (2009) Cutaneous infection caused by *Macrophomina phaseolina* in a child with acute myeloid leukemia. J Clin Microbiol 47:1969-1972
  38. Umechuruba CI, Otu KA, Ataga AE (1992). The role of seed-borne *Aspergillus flavus* Link Ex Fr, *Aspergillus niger* Van Tiegh and *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid on deterioration of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. Int Biodeterior Biodegradation 30:57-63
  39. Vitorino SI, Neves ESG, Gaspar F, Figueiredo Marques JJ, San Romão MV (2007) Suberin utilization by *Chrysonilia sitophila*: evidence for lipolytic enzymes production. Ciência Técn Vitivinícola 22:1-4
  40. Waites MJ, Morgan NL, Rockey JS, Higton G (2001) Industrial microbiology: an introduction. Blackwell, London, England
  41. Wang H, Jones R.W (1995) A unique endoglucanase-encoding gene cloned from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. Appl Environ Microbiol 61:2004-2006
  42. Wang H, Jones RW (1995) Cloning, characterization and functional expression of an endoglucanase-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. Gene 158:125-128
  43. Wang H, Jones RW (1999) Properties of the *Macrophomina phaseolina* endoglucanase (EGL 1) gene product in bacterial and yeast expression systems. Appl Biochem Biotechnol 81:153-160

**Table 1.** Detection of extracellular hydrolases of *Macrophomina phaseolina* isolates grown on different substrates \*

	Pec <sup>a</sup>	Amy <sup>b</sup>	Prot gel <sup>c</sup>	Prot cas <sup>d</sup>	Lip <sup>e</sup>
PEL	+	+	+	+	+
AJAM	+	+	-	-	-
CMM 527	+	+	-	+	+
CMM 932	+	+	+	+	+
CMM 979	+	+	+	+	+
CMM1048	+	+	+	+	+
CMM1091	+	+	+	+	+
CMM2100	+	+	+	+	+
CMM2105	+	+	+	+	+
MMBF564	+	+	+	-	+
MMBF808	+	+	+	+	+
MMBF16-98	+	+	+	+	+
MMBF04-10	+	+	+	+	+

\*Hydrolases detection: (+) hydrolases detected, (-) negative for substrate hydrolysis on the triplicates. <sup>a</sup>Pectinases. <sup>b</sup>Amylases. <sup>c</sup>Proteases on gelatin. <sup>d</sup>Proteases on casein. <sup>e</sup>Lipases on olive oil.

**Table 2.** Radial growth rate of *Macrophomina phaseolina* on different substrates

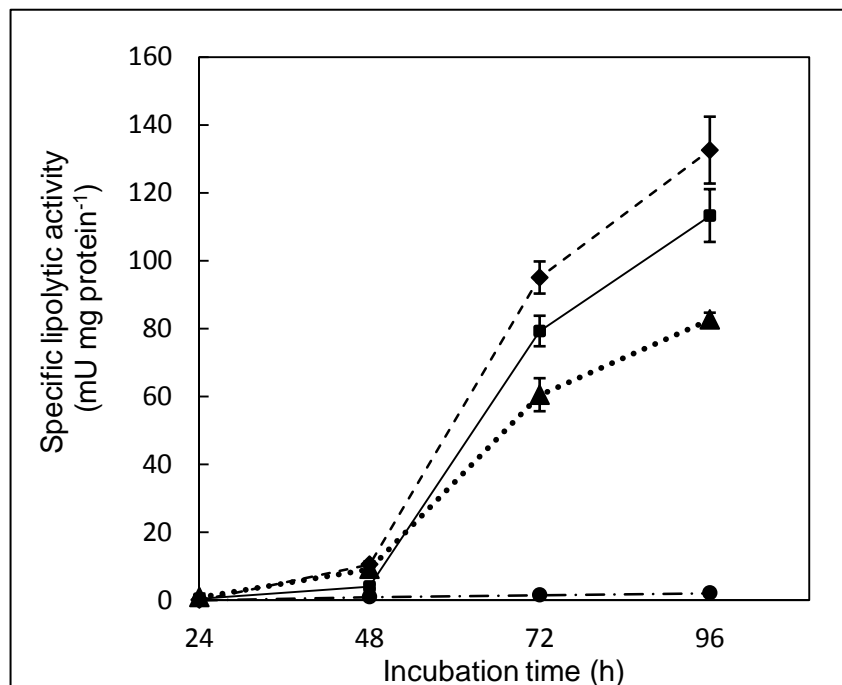
Substrate	RGR* (mm/h)
Pectin	0.90±0.44 a
Soluble starch	0.60±0.22 b
Gelatin	0.77±0.27 a
Casein	0.55±0.25 b
Olive oil	0.62±0.28 b

\*Mean radial growth rate from triplicates of thirteen isolates on the same medium. Means followed by the same letter do not differ statistically from each other (Scott-Knott test,  $P < 0.05$ ).

**Table 3.** Radial growth rate of *Macrophomina phaseolina* isolates grown on different substrates \*

Substrates	Pectin	Soluble starch	Gelatin	Casein	Olive oil	PDA
PEL	0.64±0.09 e	0.68±0.02 b	1.06±0.04 a	0.96±0.02 a	0.98±0.03 a	1.05±0.05 b
AJAM	0.22±0.01 g	0.19±0.05 c	0.28±0.01 d	0.04±0.01 h	0.07±0.01 h	0.06±0.01 i
CMM 527	0.62±0.08 e	0.72±0.04 b	0.72±0.20 b	0.83±0.03 b	0.74±0.01 b	0.61±0.02 f
CMM 932	0.45±0.06 f	0.26±0.18 c	0.35±0.17 d	0.24±0.02 g	0.34±0.02 g	0.45±0.01 g
CMM 979	1.05±0.06 d	0.67±0.02 b	0.98±0.03 a	0.63±0.05 c	0.78±0.01 b	0.74±0.01 d
CMM1048	1.38±0.05 b	0.58±0.01 b	0.84±0.06 b	0.55±0.08 d	0.76±0.01 b	0.49±0.02 g
CMM1091	1.62±0.07 a	0.72±0.02 b	1.06±0.03 a	0.89±0.01 b	0.98±0.05 a	0.61±0.06 f
CMM2100	1.21±0.22 c	0.62±0.04 b	0.91±0.03 a	0.58±0.03 d	0.65±0.03 c	0.41±0.01 g
CMM2105	1.25±0.08 c	1.02±0.01 a	0.98±0.03 a	0.69±0.08 c	1.00±0.01 a	1.02±0.01 b
MMBF564	0.78±0.03 e	0.68±0.11 b	0.78±0.03 b	0.45±0.01 e	0.30±0.01 g	0.69±0.02 e
MMBF808	0.97±0.03 d	0.56±0.03 b	0.57±0.04 c	0.36±0.04 f	0.52±0.02 e	0.85±0.03 c
MMBF16-98	0.26±0.04 g	0.38±0.01 c	0.47±0.09 c	0.47±0.02 e	0.41±0.08 f	0.21±0.06 h
MMBF04-10	1.28±0.10 c	0.60±0.27 b	0.93±0.07 a	0.49±0.03 e	0.59±0.04 d	1.33±0.07 a

\*Mean radial growth rate (mm/h) and standard error of three determinations. Means followed by the same letter do not differ statistically from each other (Scott-Knott test,  $P < 0.05$ ).



**Fig. 1.** Extracellular lipase production by *M. phaseolina* isolates PEL (diamond), CMM 2105 (square), MMBF 04-10 (triangle) and MMBF 808 (circle) in minimal mineral salts medium with olive oil as inducer.

SCHINKE, C.; GERMANI, J. C. Screening Brazilian *Macrophomina phaseolina* isolates for alkaline lipases and other extracellular hydrolases. Barcelona: **Int. Microb.**, vol. 15, n. 1, p. 1-7, 2012.

## **2. Artigo aceito para publicação no Enzyme Research**

### **Recovery of Extracellular Lipolytic Enzymes from *Macrophomina phaseolina* by Foam Fractionation with Air**

Claudia Schinke, José Carlos Germani

Laboratório de Tecnologia Bioquímica, Faculdade de Farmácia,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752 sala 709, 90610-000

Porto Alegre, RS, Brazil



## Summary

*Macrophomina phaseolina* was cultivated in complex and simple media for the production of extracellular lipolytic enzymes. Culture supernatants were batch foam fractionated for the recovery of these enzymes and column design and operation included the use of P 2 frit (porosity 40 to 100  $\mu\text{m}$ ), air as sparging gas at variable flow rates, and Triton X-100 added at the beginning or gradually in aliquots. Samples taken at intervals showed the progress of the kinetic and the efficiency parameters. Best results were obtained with the simple medium supernatant by combining the stepwise addition of small amounts of the surfactant with the variation of the air flow rates along the separation. Inert proteins were foamed out first, and the subsequent foamate was enriched in the enzymes, showing estimated activity recovery (R), enrichment ratio (E) and purification factor (P) of 45 %, 34.7, and 2.9, respectively. Lipases were present in the enriched foamate.

Keywords: *Macrophomina phaseolina*; lipases; foam fractionation; air flow rate.

## Introduction

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. [1], the only species of its gender, is a phytopathogenic filamentous fungus, belonging to the anamorphic Ascomycota, Botryosphaeriaceae family [2]. It was recently described as possessing “tools to kill” [3] due to its genome providing a diversified arsenal of enzymatic and toxin tools to destroy the host plants, a capacity that is confirmed by its ability to infect over 500 different plant species [4]. Thus, to presume that *Macrophomina phaseolina* is able to produce several enzymes suitable for industrial applications is a reasonable hypothesis.

To this purpose, many studies on its cell wall degrading hydrolases were performed [5-12]. However, *M. phaseolina* produces several other extracellular enzymes [13] of potential industrial use, among them lipolytic enzymes, which are excreted into the culture media in different amounts depending on the strain and incubation conditions. No studies were found attempting to purify these lipolytic enzymes.

Several processes in the food industry, as well as environmental and industrial biotechnological applications, use enzymes as biocatalysts [14] due to their many advantages over chemical catalysts: the ability to function under relatively mild conditions of temperature, pH, and pressure; their specificity, and in some cases, their stereoselectivity. In addition, they do not produce unwanted by-products [15]. Lipases are of particular interest because of their many applications in oleochemistry, organic synthesis, the detergent industry, and nutrition [16], and there is constant search for new options [17].

Eco-friendly technologies are nowadays one of industry’s biggest concerns [18]. Foam fractionation, an adsorptive bubble separation technique, has gained attention in recent years as it is environment compatible, cost effective, and a gentle method for the recovery and enrichment of proteins and enzymes [19-24]. Proteins interact with the gas-water interface by means of electrostatic or hydrophobic forces, which promote their selective adsorption on the bubble film according to surface activity characteristics. Those proteins that reduce surface tension will be preferably adsorbed at the interface and concentrated in the foamate, the resulting foam that leaves the foam fractionation column [25], while inactive species remain in the bulk solution.

Most experiments with protein foam fractionation shown in the literature use nitrogen to generate the foam, as its use is believed to avoid oxidation of sensitive molecules [22, 25]. Nonetheless, it was shown that denaturation at the gas–liquid interface is not primarily caused by oxidation, as proven by comparing the results from fractionation with air to those with nitrogen [26]. Studies using air [27, 28] report that recovery depends on the enzyme, pH of the bulk solution and the gas composition, in which air fares equal or better than nitrogen [29].

In foam fractionation experiments with enzymes, usually P 3 frits (porosity 16 to 40  $\mu\text{m}$ ) are employed, which produce very small bubbles, favoring protein recovery. However, it has been demonstrated that larger bubbles increase enrichment [30, 31]. Some works, which start from bulk solutions of known protein/enzyme content, show the influence of gas flow rate on enrichment and recovery during batch foaming [32, 33]. No reports were found showing the influence on the efficiency parameters of varying the gas flow rate during a batch foam separation.

Most studies with complex protein mixtures, like culture supernatants, show results without showing the evolution of the process. Besides, when a surfactant was used to help foam fractionate enzymes, the majority of experiments report the addition of a not negligible amount of the substance to the initial solution [21, 33, 34], which could render the purified enzymes suitable for restricted applications [35]. Some reports even show that the use of a surfactant denatured the enzyme [28].

*Macrophomina phaseolina* produces extracellular lipolytic enzymes in rich liquid culture medium at pH 6.8, reaching peak specific activity in four days [36, 37]. To optimize the conditions for production, in the present work the complex medium was used at different pH and incubation temperatures. The fungus was also cultivated in a simple mineral salts medium containing Tween 80. The batch foam fractionation of the extracellular lipolytic enzymes of both culture supernatants was attempted. The influence on the efficiency parameters of using a P 2 frit (porosity 40 to 100  $\mu\text{m}$ ) and varying the air flow rate during the fractionation was also investigated. Triton X-100 was used, and the effect of its sequential addition was studied.

## Material and Methods

### Equipment and reagents

Reagents and cultivation media were bought from Himedia (India), Merck (Germany), Vetec and Nuclear (Brazil). Extra-virgin olive oil was of commercial grade (La Violetera, Spain), Triton X-100 and Tween 80 from Merck (Germany), Lipozyme TL 100 from Novozymes Latin America Ltda, bovine serum albumin (BSA) from INLAB Alamar Tecno-Científica Ltda. (Brazil). A Minisart (Sartorius) filter, porosity 0.2  $\mu\text{m}$ , was used for filter sterilizing. The rotatory shaker with controllable temperature was from Oxylab (Brazil), and the Wallac Envision 2104 Multilabel Reader (Perkin Elmer) spectrophotometer was used with the Wallac Envision Manager 1.12 software for microplate readings. The following equipment was also used: a rotameter of 2 to 20  $\text{l h}^{-1}$  from Heinrichs Messgeräte (Germany), and activated carbon and sterilizing air filters FR-1200, FTC-1200 and FTA-1200 from BelAir Pneumática & Hidráulica (Brazil).

### Microorganism

*Macrophomina phaseolina* isolate MMBF 04-10 was obtained from the Micoteca Mário Barreto Figueiredo of the Instituto Biológico da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Governo do Estado de São Paulo, Brazil. The microorganism was cultivated on potato-dextrose-agar plates and mycelium discs of 0.5 cm in diameter were cut out and kept in sterilized water for future inoculations.

### **Influence of the medium composition and pH, and the incubation temperature and time on the extracellular lipolytic activity of *M. phaseolina***

The microorganism was cultivated in a complex medium consisting of (per liter) 20 g Bacto proteose peptone nr. 3, 0.6 g  $\text{MgSO}_4$ , 1.0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , and 1.0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , and pH was adjusted to 4.5, 5.5 or 6.5 with 1 M HCl prior to sterilization. Filter sterilized olive oil (0.8% v/v) was added, as well as three mycelium discs per 100 ml of medium. Incubation at each pH was done at 25 °C, 30 °C and 35 °C for 96 h in a rotatory shaker at 160 rpm. The samples, taken at 24 h intervals, and the final broth were filtered under vacuum and stored at -17 °C until analysis.

Production of extracellular lipolytic enzymes was also tested in a simple medium containing no protein, consisting of (per liter) 2.0 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 2.0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2 g  $\text{MgSO}_4$ , 0.14 g

CaCl<sub>2</sub>, 0.2 g NaCl<sub>2</sub> [38], and 0.4% (v/v) Tween 80, pH 5.5. The simple medium was added of trace elements solution (2 ml l<sup>-1</sup>) consisting of (per liter) 0.005 g CuSO<sub>4</sub>, 0.08 g FeCl<sub>3</sub>, 0.09 g ZnSO<sub>4</sub>, 0.03 g EDTA [39]. Three discs of mycelium were added per 100 mL of medium and incubated at 30 °C for 96 h at 160 rpm. The samples, taken every 24 h, and the final broth were treated as described for the complex medium.

### **Foam fractionation**

**Culture conditions** - For foam fractionation purposes, the microorganism was cultivated in the complex and simple media at pH 5.5, 30 °C at 160 rpm for 72 h, and the broth was filtered as mentioned above.

The culture supernatant from the complex and simple media showed a pH of 6.3 and 4.3, respectively.

**Adjustment of pH** - Culture supernatant was subjected to isoelectric precipitation tests using buffers at different pH, and precipitated obtained at pH 4.4 and in the range of pH 5.6 to 7.0 showed higher lipolytic activities. The pH of the complex medium was adjusted to 5.8 with HCl 0.1 M before foaming.

**Equipment and experimental procedure** - Foam fractionation glassware was similar to that described elsewhere [35], except for using a P 2 frit (porosity 40 to 100 µm) and a 300 ml drainage bowl (diameter, 8.4 cm). Filter-sterilized air from a compressor was let through the frit and bubbled in the liquid, generating a column of rising foam. The drained foam leaving the top of the column (foamate) was collected in a receiving flask. Culture supernatants (100 ml) were added of Triton X-100 before fractionation, and all experiments were done at room temperature (23-25 °C). Foamate samples were collected at different intervals and allowed to collapse at 4 °C before analysis. Protein content and lipolytic activity were determined in the initial solution and foamate samples.

### **Lipolytic activity**

**Qualitative assay** - Rodamine B plate method [40] containing 0.8 % filter sterilized olive oil was used to verify the hydrolytic activity on normal chain triacylglycerols of 10 µl foamate samples showing the highest purification factor. Lipozyme TL 100 was used as positive control. Plates were incubated at room temperature for 4 days. The development, around the inoculation well, of a yellow-orange halo against a pink background when visualized under 350 nm UV light denotes triacylglycerol hydrolysis. Each sample was tested in duplicate.

Quantitative assay - 4-nitrophenyl palmitate (pNPP) was used as substrate using Tris-HCl buffer, pH 8, and 30 min incubation at 45 °C. Absorbance was read at 410 nm using heat inactivated sample as blank ( $\epsilon = 15 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ) [41]. One unit (U) of lipolytic activity was defined as the amount of enzyme that liberates 1  $\mu\text{mol}$  of 4-nitrophenol (pNP) per minute per ml. The specific lipolytic activity ( $\text{U mg}^{-1}$  protein) was calculated. Each sample was tested in triplicate.

### Protein determination

Protein content was determined according to the Lowry method [42] using BSA as standard.

### Calculations

The following calculations were considered:

$$\text{Foamate rate (ml min}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Volume (ml) of foamate}}{\text{Time (min) to fractionate}}$$

$$\text{Protein recovery rate (mg min}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Protein (mg) in foamate}}{\text{Time (min) to fractionate}}$$

$$\text{Lipolytic activity recovery rate (U min}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Activity (U) in foamate}}{\text{Time (min) to fractionate}}$$

$$\text{Protein recovery (\%)} = \frac{\text{Mass (mg) of protein in foamate}}{\text{Mass (mg) of protein in initial solution}} \times 100$$

$$\text{Lipolytic activity recovery (R) (\%)} = \frac{\text{Total activity (U) in foamate}}{\text{Total activity (U) in initial solution}} \times 100$$

$$\text{Protein enrichment ratio} = \frac{\text{Protein (mg ml}^{-1}\text{) in foamate}}{\text{Protein (mg ml}^{-1}\text{) in initial solution}}$$

Lipolytic activity enrichment ratio (E) =  $\frac{\text{Activity (U ml}^{-1}) \text{ in foamate}}{\text{Activity (U ml}^{-1}) \text{ in initial solution}}$

Activity (U ml<sup>-1</sup>) in initial solution

Purification factor (P) =  $\frac{\text{Specific activity (U mg}^{-1} \text{ protein) of foamate}}{\text{Specific activity (U mg}^{-1} \text{ protein) of initial solution}}$

Specific activity (U mg<sup>-1</sup> protein) of initial solution

## Results and discussion

### Influence of the medium composition and pH, and the incubation temperature and time on the extracellular lipolytic activity of *M. phaseolina*

Extracellular lipolytic activity of *M. phaseolina* cultivated in complex and simple media is shown in

Figure 1.

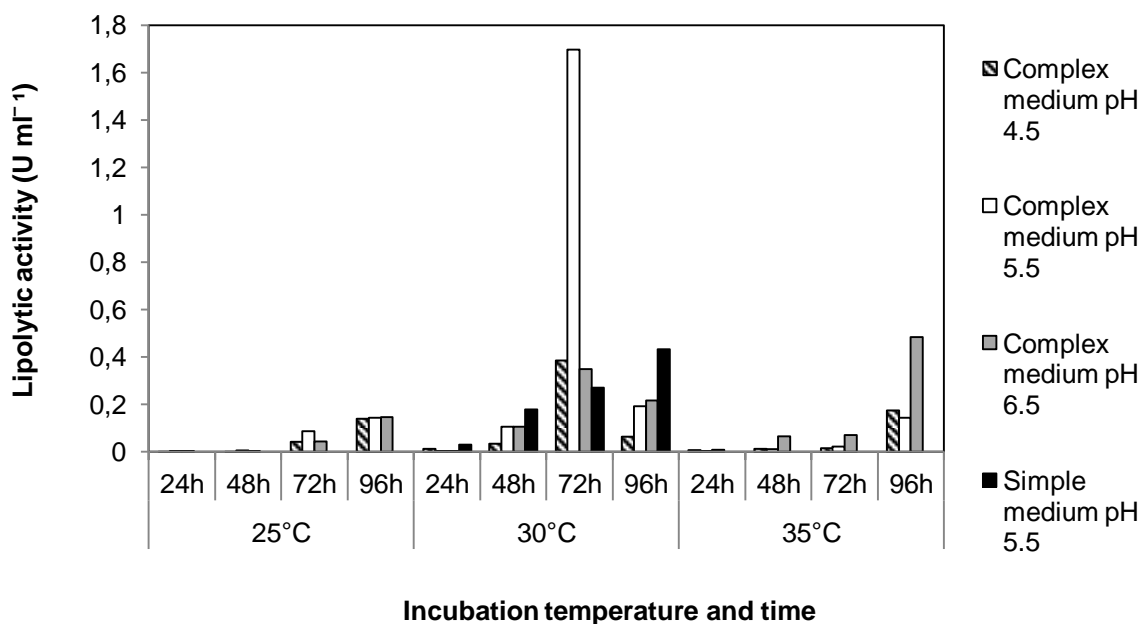


FIGURE 1: Extracellular lipolytic activity of *Macrophomina phaseolina* cultivated in complex medium (mineral salts, proteose peptone and olive oil) and simple medium (mineral salts and Tween 80), incubated at various pH and temperatures.

In the complex medium at 25 °C and 35 °C, activity increased with time of incubation at the three levels of pH, reaching its maximum after 96 h of incubation. However, at 30 °C, peak activities at

the three pH levels were reached 24 h earlier, and the activity at pH 5.5,  $1.7 \text{ U ml}^{-1}$ , was 400 % higher than at the other two pH levels. When cultivated in mineral salts medium with Tween 80 at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 5.5, activity showed a steady increase during the whole cultivation period, reaching maximum ( $0.43 \text{ U ml}^{-1}$ ) after 96 h of incubation.

### **Foam fractionation of culture supernatant from *M. phaseolina* cultivated in the complex medium**

Proteose peptone was among the components of the complex medium and, due to the short period of cultivation (72 h), it possibly was not completely consumed by the fungus. Thus, it was probably present in a not negligible amount in the culture supernatant that was foam fractionated. Proteoses and peptones, as amino acid polymers, are amphiphiles and present surface activity when in aqueous solution in contact with air. The basis for the foam fractionation of a mixture of amino acid polymers is the difference in their physicochemical behavior at the bubble surface [33], e.g. differences in their surface activity. Solutes presenting higher activity are preferably adsorbed to those of lesser activity and, thus, become concentrated in the foamate.

Bubbling air into the plain supernatant from *M. phaseolina* cultivated in the complex medium did not produce any ascending foam, probably due to the presence of lipid residues. Lipids can cause rupture of the bubble film through a Marangoni effect [43], and often present high surface activity and compete with proteins for the interfacial area even at relatively low concentrations, thus reducing the stability of protein-stabilized foams [44]. Triton X-100 (1.16 mM) was added to help solubilize lipid residue and stabilize foam. Foamate, obtained only at the maximum air flow allowed by the rotameter ( $20 \text{ l h}^{-1}$ ), was collected for 2 min, after which the foam collapsed. Results for protein enrichment and lipolytic activity enrichment ratios and purification factor for this sample, as well as for the subsequent ones, are shown in Table 1. The foamate showed high protein enrichment ratio, but lipolytic activity enrichment ratio near 1, indicating that proteins other than the enzymes became concentrated in the foamate. Due to the high gas flow rate that created turbulence in the column, it is possible that the activity shown by this sample was due to the cosorption of the enzymes to the other protein species present in the supernatant and thus transferred to the foamate. No purification occurred.



TABLE 1: Protein enrichment ratio, lipolytic activity enrichment ratio, and purification factor of foamate during foam fractionation with 20 l h<sup>-1</sup>, and 7.5 l h<sup>-1</sup> of culture supernatant from *Macrophomina phaseolina* cultivated in the complex medium.

Air flow	20 l h <sup>-1</sup>				7.5 l h <sup>-1</sup>			
Drainage bowl	With				Without			
	Samples							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Protein enrichment ratio	5.89	5.00	2.44	1.55	1.22	1.78	1.44	1.22
Lipolytic activity enrichment ratio	0.92	0.94	0.95	0.21	0.11	0.02	0.07	0.02
Purification factor	0.16	0.19	0.39	0.13	0.09	0.01	0.05	0.02

To verify whether it was possible to obtain further fractionation after foam collapse, the air flow was reduced to 7.5 l h<sup>-1</sup>, the drainage bowl was removed and the horseshoe bend was attached directly to the column. It allowed fractionating for further 27 min and successive foamate samples were collected at no fixed time intervals. Compared to 20 l h<sup>-1</sup>, the first two foamate samples at 7.5 l h<sup>-1</sup> (Table 1) showed decrease in protein concentration, and no enrichment in lipolytic activity. Subsequent foamate at 7.5 l h<sup>-1</sup> presented a decrease both in protein content and in activity. Fractionation preferably adsorbed protein species showing higher surface activity but no enzymatic activity. This is seen from the sharp decrease in the activity enrichment to a level well below 1, while the protein enrichment remained above 1. The removal of the drainage bowl and the relatively high air flow provided for a reduced retention time in the column, not allowing for a good separation between contaminating proteins (proteoses and peptones) and the enzymes present in the supernatant. Thus, removal of the drainage bowl and reduction of the air flow to the minimum necessary to obtain foamate proved to be unsatisfactory for both protein enrichment and activity enrichment. Foam fractionation of the complex medium resulted in total recoveries of protein and lipolytic activity of 56 % and 6 %, respectively. Purification was negligible.

### Foam fractionation of culture supernatant from *M. phaseolina* cultivated in the simple medium

To avoid the presence of proteins of exogenous origin as well as lipid residues in the supernatant, *M. phaseolina* was cultivated in a simple medium consisting of mineral salts. As carbon source and stimulant for the production of extracellular lipolytic enzymes, Tween 80 was added.

Similarly to the complex medium, no ascending foam was produced by the plain supernatant, even at the maximum air flow, 20 l h<sup>-1</sup>. Two experiments were then devised to determine the influence of different concentrations of Triton X-100 on the foam fractionation of this supernatant. In the first experiment, 0.44 mM was added, and three different air flow rates (2.0, 5.0 and 7.5 l h<sup>-1</sup>) were tested in sequence during 40, 10 and 10 min, respectively, on the same supernatant sample. Foamate samples were collected at fixed time intervals. Each change in air flow was preceded by foam collapse at the previous air flow rate. Figure 2A shows the results of the kinetic parameters studied - foamate rate, protein recovery rate and lipolytic activity recovery rate of the samples along the elapsed time during the fractionation process.

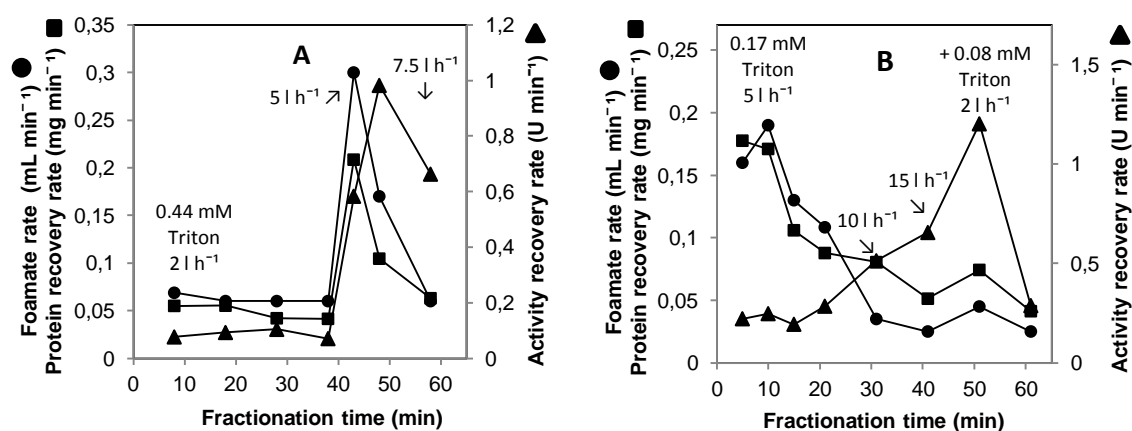


FIGURE 2: Foamate rate (circles), protein recovery rate (squares) and lipolytic activity recovery rate (triangles) during foam fractionation of culture supernatant from *Macrophomina phaseolina* cultivated in the simple medium. (A) = Triton 0.44 mM. (B) = Triton 0.17 mM + 0.08 mM after 50 min.

At 2 l h<sup>-1</sup>, all three parameters were low, and the foamate rate was around 60 µl per minute. After foam collapse at 2 l h<sup>-1</sup>, air flow rate was set to 5 l h<sup>-1</sup> to obtain further foamate, and initially all three parameters increased, especially the activity recovery rate, which showed a 500 % increase. However, the next sample collected at this air flow showed decrease in foamate and protein recovery

rates. Surprisingly, however, the activity recovery rate almost doubled. The enhancement of this activity recovery at the expense of other protein molecules might result from the reduced concentration of inert proteins, which were foamed out of the system during the previous phase. After this second sample at  $5 \text{ l h}^{-1}$ , foam collapsed again. At further increase in air flow,  $7.5 \text{ l h}^{-1}$ , only one sample was obtained. It showed further decrease in the three parameters, foamate and protein recovery rates returning to levels similar to those at  $2 \text{ l h}^{-1}$ , but activity recovery rate still at  $0.66 \text{ U min}^{-1}$ . The experiment was terminated at this point.

The reasoning behind the second experiment was based on results obtained in the first one, namely the effect of Triton X-100 on the selective fractionation of the inert proteins at the initial low air flow. As Triton itself is a contaminant, it is desirable to keep its concentration as low as possible. Thus, the effect of a reduced initial concentration in Triton, along with the effect of further addition of very small quantities of the surfactant, was investigated. The initial concentration was  $0.17 \text{ mM}$ , 60 % less than in the previous experiment.

Foaming processes are very sensitive to gas flow [33, 45]. Similar to the first experiment, in the second experiment air flow rates of  $5.0$ ,  $10.0$ ,  $15.0$  and  $2.0 \text{ l h}^{-1}$  were tested in sequence during 20, 10, 10, and 20 min, respectively, and each change in air flow was preceded by a foam collapse. Before the last change in air flow,  $0.08 \text{ mM}$  Triton X-100 was added to the system. Due to the initial smaller quantity of Triton used in this second experiment, the lowest air flow rate that enabled foamate formation was  $5 \text{ l h}^{-1}$ , 2.5 higher than the initial air flow in the first experiment. Figure 2B shows the results of the kinetic parameters foamate rate, protein recovery rate and lipolytic activity recovery rate of the samples along the elapsed time during the fractionation process. As expected, in this second experiment the initial foamate rate was much higher than in the previous experiment (Figure 2A), as higher gas flow rates produce wetter foams due to reduced residence time in the column and less drainage. Foamate rate decreased over time, despite increase in the air flow. However, it did show a slight increase when additional Triton X-100 was introduced into the system, an effect that did not persist with further foaming. Protein recovery rate followed this same pattern. Lipolytic activity recovery rate was very low at the initial air flow, doubling when the gas flow was set at  $10 \text{ l h}^{-1}$ , and increasing further at  $15 \text{ l h}^{-1}$ . However, a sharp increase in activity recovery rate was noticed when the additional Triton X-100 was introduced, reaching  $1.2 \text{ U min}^{-1}$ . The effect did not persist and with further foaming the activity recovery rate descended to the initial levels.

Figure 3 shows the efficiency parameters - protein enrichment ratio, lipolytic activity enrichment ratio and purification factor of the foamate samples along the time of the fractionation process for both experiments. In the first experiment, seen in Figure 3A, at  $2 \text{ l h}^{-1}$  air flow the protein enrichment ratio was high but lipolytic activity enrichment remained low (between 1.5 and 2), probably because the inert proteins were more surface active than the lipolytic enzymes, adsorbing faster and firmer to the bubble film. Differences in surface activity derive from differences in the molecule surface characteristics, like the tridimensional conformation, the electrostatic balance and hydrophobic properties of the protein. In addition, it was shown that the composition of a mixed-protein film is kinetically driven, and primarily controlled by the rate of arrival of each protein at the interface and the area available at the interface for molecular adsorption. A later-arriving protein, even if showing greater affinity for the interface than the first-arriver, could not displace it from the surface [46]. Lipases and esterases, extracellular lipolytic enzymes commonly produced by microorganisms, are macromolecules mainly of globular shape, demanding bigger areas at the interface to be able to adsorb. Besides, due to their size, their movement in the liquid might be hindered by the smaller-sized proteins and other macromolecules possibly present. These phenomena could have contributed to the selective removal of the inert proteins first at the initial low gas flow rate. As fractionation proceeded, Triton X-100 was steadily removed from the system with the successive foamate samples and the bulk solution became increasingly depleted in it. The low molecular weight surfactant has 100% affinity to the interface, which causes its high rate of adsorption [47], and thus foams out first leaving the kinetically slower macromolecules behind. As consequence, the proteins still present in the bulk solution, among them the enzyme macromolecules, form an increasingly cohesive viscoelastic film at the air-water interface, increasing the film's viscosity, which demands a higher air flow to generate ascending foam.

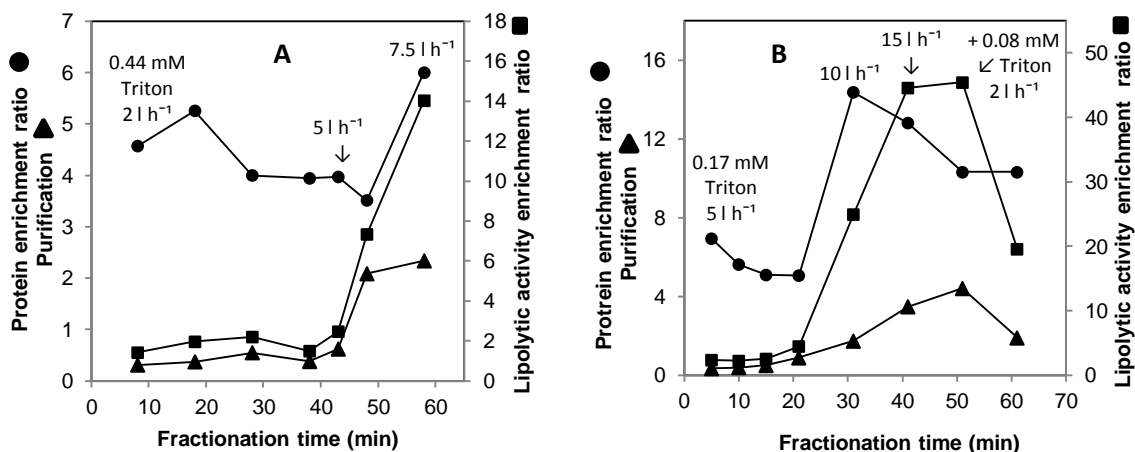


FIGURE 3: Protein enrichment ratio (circles), lipolytic activity enrichment ratio (squares) and purification factor (triangles) during foam fractionation of culture supernatant from *Macrophomina phaseolina* cultivated in the simple medium. (A) = Triton 0.44 mM. (B) = Triton 0.17 mM + 0.08 mM after 50 min.

After collapse of the foam at  $2 \text{ l h}^{-1}$ , the increase of air flow to  $5 \text{ l h}^{-1}$  caused additional decrease in the protein enrichment ratio. When the flow was altered to  $7.5 \text{ l h}^{-1}$  a sharp increase in the sample's protein content was noticed, reaching the highest level obtained in the experiment. The lipolytic activity enrichment ratio was negligible at  $2 \text{ l h}^{-1}$ , showing an average of 1.8, increasing sharply at  $5 \text{ l h}^{-1}$  and at  $7.5 \text{ l h}^{-1}$ , at which point enrichment was 14. The high protein content and low activity of the initial foamate samples reflected in no purification. However, at the  $5 \text{ l h}^{-1}$  air flow, the purification factor doubled, reaching 2.1, due to the threefold increase in the lipolytic activity without increase in protein content. The only sample obtained at  $7.5 \text{ l h}^{-1}$  air flow showed the highest purification factor, 2.3, and after foam collapsed, the experiment was terminated.

In the second experiment, the lowest air flow to produce foamate was  $5 \text{ l h}^{-1}$ . Protein enrichment ratios (Figure 3B) of the samples obtained at this initial air flow rate were higher than those obtained with the initial air flow in the first experiment (Figure 3A), here, as there, also showing a steady decrease with time. The reason for this enhanced protein enrichment ratio at the initial gas flow in the second experiment is that higher flow rates produce more bubbles, which results in increased area available for protein adsorption. In addition, larger bubbles are obtained with frits of higher porosity, as in the present case, and as mentioned elsewhere [30, 31, 48] larger bubbles favor higher enrichments due to lesser liquid holdup and greater drainage. Doubling the gas flow to  $10 \text{ l h}^{-1}$  caused

a sharp increase in protein enrichment. However, further increase in air flow or addition of Triton X-100 did not prevent the protein enrichment ratio from decreasing over fractionation time.

With an average of 2.9, the lipolytic activity enrichment ratio (Figure 3B) of the samples obtained at the initial air flow rate was double of that obtained at the initial flow rate in the first experiment (Figure 3A), also repeating the pattern of steady ratio during this phase of foaming. After the twofold and threefold increase in air flow rate in this second experiment, samples showed a very small volume, around 300  $\mu\text{l}$  collected over 10 min foaming, and appeared viscous. As Figure 3B shows, these two samples collected at 10 and 15  $\text{l h}^{-1}$  enriched big amounts of protein, among them the lipolytic enzymes. Activity enrichment ratio obtained at 15  $\text{l h}^{-1}$  was 44.6. As mentioned above, increased flow rates result in increased area available for adsorption, and more proteins, in the present case the lipolytic enzymes, are carried to the foamate.

After no further foamate was obtained at these air flow rates, a small amount of Triton X-100, 0.08 mM, was added to the bulk solution, gas flow was reduced to the minimum, 2  $\text{l h}^{-1}$ , and two additional foamate samples were obtained. The experiment was terminated at this point.

Figure 2B shows that this increased the foamate rate, protein recovery rate and activity recovery rate, probably due to the decrease in the foam's viscosity. However, the last sample, collected around 60 min, showed a big decrease in the activity recovery rate. Figure 3B shows that the foamate collected around 50 min showed an activity enrichment ratio only slightly superior to that of the previous sample despite its increase in activity recovery rate (Figure 2B). That is, more activity was recovered per time unit, however with a concentration ( $\text{U ml}^{-1}$ ) very similar to the previous sample. The effect did not persist and the last sample showed a stable content in protein (Figure 3B), but a reduced content in enzyme. The increased recovery of the enzyme with the second addition of Triton can be explained by the fact that protein concentration in the bulk solution was decreasing, as seen from the steadily diminishing protein recovery rates, even at higher air flow rates. The initial foamate contained mostly inert proteins, and when it became necessary to increase air flow, the bulk solution was enriched in the lipolytic enzymes. Thus, protein fractionated at these higher air flows were mainly lipolytic enzymes. However, protein content in the bulk solution after fractionation at 15  $\text{l h}^{-1}$  was not enough to allow the formation of a stable foam and further foaming. When the small amount of additional Triton was introduced into the system, it enabled the creation of a flexible film due to cosorption of Triton and enzyme at the air-liquid interface [49]. The flexible film could now be foamed,

enriched in lipolytic enzymes. Again, as foaming proceeded, Triton became depleted to the extent that activity recovery rate of the last sample fell dramatically (Figure 2B).

As seen from Figure 3B, the purification factor started to reach values above 1.5 only after the air flow was increased above  $5 \text{ l h}^{-1}$ . The addition of Triton helped to increase purification by 26% over the previous sample, and it reached a factor of 4.4.

Table 2 shows the estimated protein recovery (%) and enrichment ratio, lipolytic activity recovery (R) (%) and enrichment ratio (E), as well as the purification factor (P), if all the samples collected had been pooled in one foamate sample. It also shows the same calculations for the set of samples in each experiment that showed the best results in the efficiency parameters. That is, in the first experiment, only the samples collected at  $5 \text{ l h}^{-1}$  and  $7.5 \text{ l h}^{-1}$  air flow rates, and in the second experiment those collected at  $10 \text{ l h}^{-1}$ ,  $15 \text{ l h}^{-1}$  and  $2 \text{ l h}^{-1}$  flow rates.

From both experiments it becomes evident that the overall estimated activity recovery and purification factor obtained with foam fractionation using air and a P 2 frit are not as high as those obtained with P 3 frits and nitrogen for lipase from *Pleurotus sapidus* (R = 95%, P = 11.6) [35] and *Fusarium spec.* (R = 93.6 %, P = 5.9) [24], and esterases from *Pleurotus sapidus* (R = 89.3 %, P = 16.0) [39]. However, foam fractionation of cutinase from *Coprinopsis cinerea* with a P 3 frit and air obtained R = 79%, E = 10.5 and P = 2.5 [33], results not too far from the present ones.

Nevertheless, here is demonstrated the possibility to foam fractionate in stages, using the combined effect of air flow rate and use of surfactant as means to separate protein species. This is most evident in the second experiment. Different from other studies [33], in which activity recovery fell from 80 % to 6% and purification factor from 4.3 to 1.1 when 0.2 % Tween 80 was added to the solution in the column, it also shows that the addition of very small quantities of surfactant helps to increase recovery of the enzyme. By foaming out contaminating proteins first, and then adjusting gas flow and stepwise addition of surfactant, it was possible to separately collect highly enriched foamate. Future work using a P 3 frit (porosity 16 to  $40 \mu\text{m}$ ), a larger drainage bowl as suggested elsewhere [35], and the adjustment of air flow to the strategy here devised, could improve the recovery of the lipolytic enzymes.

TABLE 2: Estimated protein recovery (%) and enrichment ratio, lipolytic activity recovery (%) and enrichment ratio, and purification factor of foam fractionation of the culture supernatant from *Macrophomina phaseolina* cultivated in a simple medium.

		1st experiment		2nd experiment	
		Pool <sup>a</sup>	Samples <sup>b</sup>	Pool <sup>a</sup>	Samples <sup>c</sup>
Protein recovery	%	24	13	33	15
Activity recovery	%	23	19	54	45
Protein enrichment ratio		4.3	4.2	7.6	11.9
Activity enrichment ratio		4.2	6.2	12.4	34.7
Purification factor		0.98	1.5	1.6	2.9

<sup>a</sup>Calculated for all samples taken together. <sup>b</sup>Calculated for the samples collected at 5 l h<sup>-1</sup> and 7.5 l h<sup>-1</sup> air flow rates taken together. <sup>c</sup>Calculated for the samples collected at 10 l h<sup>-1</sup>, 15 l h<sup>-1</sup> and 2 l h<sup>-1</sup> air flow rates taken together.

### Lipolytic activity of foamate samples

Samples collected at 50 and 60 min in the first experiment (Figure 3A) and at 40 and 50 min in the second (Figure 3B), which showed the highest purification factors, were tested on rodamine B agar. According to the literature [50-52], lipases are carboxylesterases that hydrolyze triacylglycerols, e.g. olive oil. Only the sample collected at 50 min of the second experiment (additional Triton used) showed a visible halo indicating a hydrolytic activity over normal chain triglycerides. It is possible that the other samples were not sufficiently concentrated to be able to show a positive result on rodamine B test.

### Conclusions

In summary, purification of lipolytic enzymes by foam fractionation was easier and more efficient in supernatant from *Macrophomina phaseolina* cultivated in a simple medium. Despite the long time taken in the foaming process with air, good recovery of lipolytic activity was attained and foamate contained lipases active on olive oil. By combining stepwise addition of surfactant and variable air flow



rates, a new approach to foam fractionation could be devised. Advantages were the use of an easily available gas source, and the reduced use of surfactant.

### Acknowledgements

The authors appreciate the financial support from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior, Ministry of Education, Brazil) in the form of a scholarship to C. Schinke.

### Conflict of Interests

There is no conflict of interests for any of the authors on this paper.

### References

- [1] <http://www.jutegenome.org/mpbrowse/>, accessed on Jan 11, 2013
- [2] P. W. Crous et al., "Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae," *Studies in Micology*, vol. 55, pp. 235-253, 2006.
- [3] S. Islam, et al., "Tools to kill: Genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*," *BMC Genomics*, vol. 13, pp. 493, 2012.
- [4] [http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/new\\_allViewGenBank.cfm?thisName=Macrophomina%20phaseolina&organismtype=Fungus&CFID=83452&CFTOKEN=983d62a385776558-E3B89C2C-90CE-F9F3-F90326F1E089AB43](http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/new_allViewGenBank.cfm?thisName=Macrophomina%20phaseolina&organismtype=Fungus&CFID=83452&CFTOKEN=983d62a385776558-E3B89C2C-90CE-F9F3-F90326F1E089AB43), accessed on April 04, 2013.
- [5] A. Sanyal et al., "Induction of carboxymethylcellulase in *Macrophomina phaseolina*," *Folia Microbiologica*, vol. 26, n. 2, pp. 83-88, 1981.
- [6] U. Roy, and V. C. Vora, "Purification and properties of a carboxymethylcellulase from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*," *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, vol. 26, n. 4, pp. 243-248, 1989.
- [7] P. K. Roy et al., "Hydrolysis of wheat bran, rice bran and jute powder by immobilized enzymes from *Macrophomina phaseolina*," *World Journal of Microbiological Biotechnology*, vol. 9, n. 2, pp. 164-167, 1993.

- [8] H. Y. Wang, and R. W. Jones, "A unique endoglucanase-encoding gene cloned from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, n. 5, pp. 2004-2006, 1995.
- [9] H. Y. Wang, and R. W. Jones, "Properties of the *Macrophomina phaseolina* endoglucanase (EGL 1) gene product in bacterial and yeast expression systems," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 81, n. 3, pp. 153-160, 1999.
- [10] A. Miettinen-Oinonen, "Cellulases in the textile industry", In: J. Polaina, and A. P. MacCabe (ed.), *Industrial enzymes: structure, function and applications*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 51-64, 2007.
- [11] L. Afouda, et al., "Development of a sensitive serological method for specific detection of latent infection of *Macrophomina phaseolina* in cowpea," *Journal of Phytopathology*, vol. 157, pp. 15–23, 2009.
- [12] S. Kaur et al., "Carbohydrate degrading enzyme production by plant pathogenic mycelia and microsclerotia isolates of *Macrophomina phaseolina* through koji fermentation," *Industrial Crops and Products*, vol. 36, n. 1, pp. 140-148, 2012.
- [13] C. Schinke, and J. C. Germani, "Screening *Macrophomina phaseolina* isolates for alkaline lipases and other extracellular hydrolases," *International Microbiology*, vol. 15, pp. 1-7, 2012.
- [14] O. Kirk, T. V. Borchert, and C. C. Fuglsang, "Industrial enzyme applications," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 13, pp. 345-351, 2002.
- [15] M. J. Waites, N. L. Morgan, J. S. Rockey, and G. Higton, *Industrial microbiology: an introduction*, Blackwell, Oxford, England, 2001.
- [16] R. K. Saxena, A. Sheoran, B. Giri, and W. Sheba Davidson, "Purification strategies for microbial lipases," *Journal of Microbiological Methods* vol. 52, pp. 1-18, 2003.
- [17] A. K. Singh and M. Mukhopadhyay, "Overview of fungal lipase: a review," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol.166, pp.486-520, 2012.
- [18] [http://ec.europa.eu/environment/archives/wssd/pdf/fs\\_industrial\\_development.pdf](http://ec.europa.eu/environment/archives/wssd/pdf/fs_industrial_development.pdf), accessed on Jan 14, 2013.
- [19] S. E. Charm, J. Morningstar, C. C. Matteo, and B. Paltiel, "The separation and purification of enzymes through foaming," *Analytical Biochemistry*, vol. 15, pp. 498-508, 1996.

- [20] C. E. Lockwood, P. M. Bummer, and M. Jay, "Purification of proteins using foam fractionation," *Pharmaceutical Research*, vol. 14, n. 11, pp. 1511-1515, 1997.
- [21] B. M. Gerken, A. Nicolai, D. Linke, H. Zorn, R. G. Berger, and H. Parlar, "Effective enrichment and recovery of laccase C using continuous foam fractionation," *Separation and Purification Technology*, vol. 49, pp. 291-294, 2006.
- [22] D. Linke, and R. G. Berger, "Foaming of proteins: new prospects for enzyme purification processes," *Journal of Biotechnology*, vol. 152, pp. 125-131, 2011.
- [23] V. Burapatana, E. A. Booth, I. M. Snyder, A. Prokop, and R. D. Tanner, "A proposed mechanism for detergent-assisted foam fractionation of lysozyme and cellulase restored with  $\beta$ -cyclodextrin," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 136-140, pp. 777-791, 2007.
- [24] J. N. Dos Prazeres, A. P. Simiqueli, G. M. Pastore, D. Linke, H. Zorn, M. Nimtz, and R. G. Berger, "Recovery of extracellular alkaline lipases of *Fusarium spec.* by foam fractionation," *Fresenius Environmental Bulletin*, vol.16, pp.1-6, 2007.
- [25] B. Burghoff, "Foam fractionation applications," *Journal of Biotechnology*, vol. 161, pp. 126-137, 2012.
- [26] J. R. Clarkson et al., "Protein denaturation in foam, I. Mechanism study," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 215, pp. 323-332, 1999.
- [27] V. Burapatana, E. A. Booth, A. Prokop, and R. D. Tanner, "Effect of buffer and pH on detergent-assisted foam fractionation of cellulose," *Industrial & Engineering Chemistry Research*, vol. 44, pp. 4968-4972, 2005.
- [28] V. Burapatana, A. Prokop, and R. D. Tanner, "Enhancing cellulase foam fractionation with addition of surfactant," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 121-124, pp. 541-552, 2005.
- [29] Z. Liu, Z. Liu, D. Wang, F. Ding, and N. Yuan, "On the denaturation of enzymes in the process of foam fractionation," *Bioseparation*, vol. 7, pp. 167-174, 1998.
- [30] F. Uraizee, and G. Narsimhan, "Foam fractionation of protein and enzymes. II. Performance and modeling," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 12, pp. 315-316, 1990.
- [31] F. Uraizee, and G. Narsimhan, "Effects of kinetics of adsorption and coalescence on continuous foam concentration of proteins: comparison of experimental results with model predictions," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 51, pp. 384-398, 1996.

- [32] S. Ko, V. Loha, A. Prokop, and R. D. Tanner, "Batch foam recovery of sporamin from sweet potato," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 70-72, pp. 547-558, 1998.
- [33] J. Merz, G. Schembecker, S. Riemer, M. Nimitz, and H. Zorn, "Purification and identification of a novel cutinase from *Coprinopsis cinerea* by adsorptive bubble separation," *Separation and Purification Technology*, vol. 69, pp. 57-62, 2009.
- [34] D. Linke, H. Zorn, B. Gerken, H. Parlar, and R. G. Berger, "Laccase isolation by foam fractionation - new prospects of an old process," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40, pp. 273-277, 2007.
- [35] D. Linke, H. Zorn, B. Gerken, H. Parlar, and R. G. Berger, "Foam fractionation of exo-lipases from a growing fungus (*Pleurotus sapidus*)," *Lipids*, vol. 40, pp. 323-327, 2005.
- [36] C. Schinke, and J. C. Germani, "Lipolytic activity of the cultivation broths of four *Macrophomina phaseolina* isolates," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 113 S1, pp. 54-55, 2011.
- [37] C. Schinke, and J. C. Germani, "Influence of pH and temperature on lipolytic activity of *Macrophomina phaseolina*," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 114 S1, pp. 248, 2012.
- [38] H. Zorn, D. E. Breithaupt, M. Takenberg, W. Schwack, and R. G. Berger, "Enzymatic hydrolysis of carotenoid esters of marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and red paprika (*Capsicum annuum* L.) by commercial lipases and *Pleurotus sapidus* extracellular lipase," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 32, pp. 623-628, 2004.
- [39] D. Linke, M. Nimitz, R. G. Berger, and H. Zorn, "Separation of extracellular esterases from pellet cultures of the Basidiomycete *Pleurotus sapidus* by foam fractionation," *Journal of the American Oil Chemist's Society*, vol. 86, pp. 437-444, 2009.
- [40] G. Kouker, and K. E. Jaeger, "Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 53, pp. 211-213, 1987.
- [41] T. Vorderwülbecke, K. Kieslich, and H. Erdmann, "Comparison of lipases by different assays," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 14, pp. 631-639, 1992.
- [42] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein Measurement with the Folin phenol reagent," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, pp. 265-275, 1951.

- [43] D. C. Clark, "Application of state-of-the-art fluorescence and interferometric techniques to study coalescence in food dispersions," In: A. G. Gaonkar (ed.), *Characterization of food: emerging methods*, Elsevier, Amsterdam, pp. 23-57, 1995.
- [44] P. J. Wilde, F. A. Husband, D. Cooper, M. J. Ridout, A. R. Mackie, P. Gunning, V. J. Morris, N. Woodward, and E. N. Clare Mills, "Interfacial mechanisms underlying lipid damage of beer foam," In: E. Dickinson, T. van Vliet (ed.) *Food colloids, biopolymers and materials*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 200-206, 2003.
- [45] J. Varley, A. K. Brown, J. W. R. Boyd, P. W. Dodd, and S. Gallagher, "Dynamic multi-point measurement of foam behavior for a continuous fermentation over a range of key process variables," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 20, pp. 61-72, 2004.
- [46] S. Damodaran, "Protein-stabilized foams and emulsions," In: S. Damodaran, A. Paraf (ed.) *Food proteins and their applications*, Dekker, New York, NY, USA, pp. 57-109, 1997.
- [47] P. A. Wierenga, and H. Gruppen, "New views on foams from protein solutions," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 15, pp. 365-373, 2010.
- [48] A. K. Brown, A. Kaul, and J. Varley, "Continuous foaming for protein recovery: Part I. Recovery of  $\beta$ -casein," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 62, pp. 278-290, 1999.
- [49] A. R. Mackie, A. P. Gunning, P. J. Wilde, and V. J. Morris, "Orogenic displacement of protein from the air/water interface by competitive adsorption," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 210, pp. 157-166, 1999.
- [50] H. Chahinian, L. Nini, E. Boitard, J. P. Dubès, L. C. Comeau, and L. Sarda, "Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl esters and TAG," *Lipids*, vol. 37, no. 7, pp. 653-662, 2002.
- [51] R. Sharma, Y. Chisti, and U. C. Banerjee, "Production, purification, characterization, and applications of lipases," *Biotechnology Advances*, vol. 19, pp. 627-662, 2001.
- [52] A. L. Willerding, "Lipase activity among bacteria isolated from Amazonian soils," *Enzyme Research*, vol. 2011, article ID 720194, 5 pp., 2011.

### 3. Resumos publicados

#### 3.1 9th Euro Fed Lipid Congress

##### **Lipolytic activity of the cultivation broths of four *Macrophomina phaseolina* isolates**

<sup>1</sup>Schinke, C.; <sup>2</sup>Ayub, M.A.Z.; <sup>2</sup>Brandelli, A. ; <sup>3</sup>Germani, J.C.

<sup>1</sup>Doctoral Program in Agricultural and Environmental Microbiology; <sup>2</sup>Food Science and Technology Institute; <sup>3</sup>Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

Lipases have been extensively studied due to their growing number of industrial applications, as in detergents, in the oils and food industry, and in the synthesis of optically pure drugs and agrochemicals. The industrial demand for new sources of lipases is continuing to stimulate the screening and isolation of new lipolytic microorganisms. *Macrophomina phaseolina* is a non specific phytopathogenic filamentous fungus of a wide variety of economically important crops like beans, corn, sunflower, and cucurbit family. The cultivation broth of *M. phaseolina* was tested for its lipolytic activity. Four Brazilian isolates were cultivated in Colen broth added with 1% (v/v) olive oil. Samples of the broth were taken at 24 hours intervals during four days, filtrated and its activity tested with 4-nitrophenolpalmitate (pNPP) at pH 8, 37°C for 15 min. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that produces 1µmol of 4-nitrophenol (pNP) per minute. The lipolytic activities of isolates MMBF 04-10, MMBF 808 and CMM 2105 grew until 96 hours of cultivation, showing maximum values of 1.48 U, 0.03 U and 1.69 U, respectively. Isolate PEL, after reaching maximum activity at 72 hours (1.54 U), maintained the activity stable until 96 hours (1.57 U). The protein content in the broth of each isolate increased until 48h (17 to 19 mg/mL). After this, the content in PEL broth decreased sharply to 9.2 mg/mL at 96 h. The other isolates also showed decrease in protein content reaching a minimum at 96 h, varying from 17.8 to 13 mg/mL. The specific activity of each sample was calculated, showing an increase over time and reaching its maximum at 96 h of cultivation for all four isolates. Isolate PEL showed the highest specific activity, 0.17 U/mg of protein, followed by CMM 2105 (0.11 U/mg), MMBF 04-10 (0.08 mg/mg) and MMBF 808 (0.002 U/mg). In conclusion, *M. phaseolina* produces lipases active at pH 8 and 37°C, and isolate PEL shows the best biotechnological potential due to its higher specific activity.

SCHINKE, C.; GERMANI, J. C. Lipolytic activity of the cultivation broths of four *Macrophomina phaseolina* isolates. **J. Lipid Sci. Technol.** S1 Online Only Supplement – Book of Abstracts of the 9th Euro Fed Lipid Congress, Rotterdam, Netherlands, p. 54-55, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.201100364/pdf> >. Acesso em 31 mar. 2013.

## 3.2 Society for Industrial Microbiology 61st Annual Meeting

### Radial Growth Rate and Production of Some Hydrolases by *Macrophomina phaseolina* in Semi-Solid Media

Claudia Schinke; José Carlos Germani

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre –  
RS, Brazil

The demand for novel enzymes of industrial use is continuing to stimulate the screening and isolation of new microorganisms. *Macrophomina phaseolina* is a non specific phytopathogenic filamentous fungus that attacks a wide variety of economically important crops like beans, corn, sunflower, and the cucurbit family, among others. Literature about extracellular enzymes produced by this fungus is sparse, the majority being on cellulases and endoglucanases. The radial growth rate of thirteen *M. phaseolina* isolates collected from several hosts at different geographical regions of Brazil was determined on semi-solid media containing different substrates, including biodiesel (100). Also, the production of extracellular pectinases, amylases, proteases, and lipases in these media was tested. The radial growth rates of the isolates were quite variable, depending on the type of substrate. The thirteen isolates also showed variability in the production of the enzymes. However, seven of them showed activity on all substrates tested. Isolate AJAM displayed a quite different profile, producing only pectinase. Proteases, pectinases and lipases were the most commonly produced enzymes. Isolate CMM 2105 distinguished itself for showing fast growth and the production of the corresponding hydrolase in all the media tested. In conclusion, some isolates of *M. phaseolina* show potential industrial use due to the production of extracellular hydrolases and high growth rates.

SCHINKE, C.; GERMANI, J. C. Radial growth rate and production of some hydrolases by *Macrophomina phaseolina* in semi-solid media. **Society for Industrial Microbiology 61st Annual Meeting**, 2011 Annual meeting & Exhibition, New Orleans, LA, USA, Jul. 2011. Disponível em: <  
<http://sim.confex.com/sim/2011/webprogram/Paper18986.html>>. Acesso em 31 mar. 2013.



### 3.3 9 SLACA – Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos

#### MORFOLOGIA DE COLÔNIAS E DETECÇÃO DE PECTINASES DE *Macrophomina phaseolina*

SCHINKE, C.; GERMANI, J.C.

Faculdade de Farmácia – Departamento de Produção de Matérias Primas,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: claudia.schinke@ufrgs.br

Pectinases são enzimas que hidrolisam substâncias pécticas. São utilizadas em sucos de frutas para diminuir a viscosidade, melhorando a filtração; na degomagem de fibras vegetais para tecelagem; na extração de óleos vegetais; na obtenção de probióticos derivados da pectina. A demanda por enzimas de uso industrial com características específicas continua a estimular a seleção e o isolamento de novos microorganismos. Porém, é necessário que o isolado selecionado apresente estabilidade genética, mantendo as características morfológicas e fisiológicas originais. Setorização é uma alteração morfológica comum em fungos filamentosos, decorrente de variabilidade genética, e os setores podem apresentar características bioquímicas diferentes. *Macrophomina phaseolina* é um fungo filamentoso fitopatogênico que infecta grande variedade de culturas economicamente importantes. O presente estudo visou caracterizar a morfologia colonial de 13 isolados de *M. phaseolina* coletados em diferentes regiões brasileiras e selecionar aqueles produtores de pectinases. Os isolados foram cultivados em ágar Batata-Dextrose, 30°C, 7 dias em estufa microbiológica, verificando-se as características das colônias. Houve grande diversidade na morfologia colonial. Um isolado apresentou crescimento restrito e os demais tomaram toda a superfície da placa. Quanto à cor do anverso, apresentaram-se de uma única cor (branco; cinza escuro; negro), centro e bordas de cores diferentes (cinza escuro, cinza claro; prateado, cinza claro; prateado, cinza escuro) ou setorizadas (branco, cinza escuro e marrom; cinza escuro e negro). No reverso, as cores variaram de cinza escuro a negro e de amarelo a marrom. Algumas formaram micélio aéreo, outras não. Para a detecção de pectinases, utilizou-se ágar de Pontecorvo (pH 6,8) adicionado de pectina cítrica. Incubouse a 30°C em estufa microbiológica por dois a cinco dias. A hidrólise da pectina foi revelada com brometo de hexadeciltrimetilamônio 1%. Todos os isolados produziram pectinases e aqueles sem setorização serão submetidos a cultivo em meio líquido para selecionar os de maior atividade pectinolítica.

Palavras chave: pectinase, *Macrophomina phaseolina*, morfologia.

SCHINKE, C.; GERMANI, J. C. Morfologia de colônias e detecção de pectinases de *Macrophomina phaseolina*. **9 SLACA – Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**: “Ciência de Alimentos e Qualidade de Vida: Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade”, Campinas, SP, Brasil, Nov. 2011. Sessão de resumos. 1 CD.

### 3.4 16th. IUFOST – World Congress of Food Science and Technology

#### INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE LIPOLYTIC ACTIVITY OF CULTIVATION BROTHS OF *MACROPHOMINA PHASEOLINA* ISOLATES

Claudia Schinke, José Carlos Germani. Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, sala 709, 90610-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Lipases are extensively studied due to the growing number of industrial applications in the oils and food industry. The demand for lipases with specific characteristics is continuing to stimulate the screening and isolation of new lipolytic microorganisms. We investigated the influence of temperature on the lipolytic activity of culture broths of *Macrophomina phaseolina* isolates CMM 2105 and PEL. Isolates were cultivated in a minerals broth added of olive oil and the activity was determined spectrophotometrically with 4-nitrophenyl palmitate at 37°C pH 8, 15 min, and 45°C pH 8.5, 30 min, every 24 h for four days. Lowry method was used for protein determination. The lipolytic activity ( $\text{U mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) of both isolates was higher at 37 °C along the incubation period. CMM 2105 showed the highest ( $1.686 \pm 0.115 \text{ U mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) at 96 h. PEL showed a higher specific lipolytic activity than CMM 2105, which was similar at both temperatures until 72 h ( $0.100 \pm 0.001 \text{ U mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ), afterwards dropping sharply at 45 °C. Its activity at 37 °C, however, continued to increase, reaching  $0.132 \pm 0.009 \text{ U mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$  at 96 h. Testing at both temperatures showed that PEL lipolytic enzymes are better suited for industrial purposes, as higher levels of specific activity develop earlier, being similar at both temperatures, and they withstand 45 °C for 30 min in mild alkaline environments.

SCHINKE, C.; GERMANI, J. C. Influence of temperature on the lipolytic activity of cultivation broths of *Macrophomina phaseolina* isolates. **16th. IUFOST – World Congress of Food Science and Technology**: “Addressing global food security and wellness through food science and technology”, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, Aug. 2012. Poster session. Disponível em: <<http://iufost.org.br/sites/iufost.org.br/files/anais/01448.pdf>>. Acesso em 31 mar. 2013.

### 3.5 10th Euro Fed Lipid Congress

#### **Influence of pH and incubation temperature on lipolytic activity of *Macrophomina phaseolina***

Claudia Schinke, José Carlos Germani. Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, sala 709, 90610-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Lipases are extensively studied due to the growing number of industrial applications in the oils and food industry. The demand for lipases with specific characteristics is continuing to stimulate the screening and isolation of new lipolytic microorganisms. We investigated the influence of incubation temperature and pH on the lipolytic activity of culture broths of *Macrophomina phaseolina* isolates. A full experimental design was done with initial pH at 3.5, 4.5 and 5.5 versus incubation temperatures at 25 °C, 30 °C and 35 °C, using strains CMM 2105, PEL and MMBF 04-10 cultivated under agitation in mineral salts broth added of olive oil as carbon source. Samples of the broths were taken at every 24 hours for 4 days. The lipolytic activity was determined spectrophotometrically with 4-nitrophenol palmitate at 45 °C for 30 min and the Lowry method was used for protein determination. The development of the activity of the three isolates depended on both the initial broth pH and the incubation temperature. PEL and CMM 2105 showed a similar pattern: highest specific activity developed at 30 °C at pH 4.5 and 6.5 at 96 h of cultivation. Strain MMBF 04-10 also showed highest specific activity when cultivated at 30 °C, however at pH 5.5. Under these conditions its activity was four times higher than that of the other two strains (0.41 U mg<sup>-1</sup> protein), developing 24 h earlier (72 h of incubation) and will be the object of further studies.

SCHINKE, C.; GERMANI, J. C. Influence of pH and incubation temperature on lipolytic activity of *Macrophomina phaseolina*. **Eur. J. Lipid Scie. Technol.** S1 Online Only Supplement – Book of Abstracts of the 10th Euro Fed Lipid Congress, Cracow, Poland, p. 248, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.201290034/abstract>>. Acesso em: 21 mar. 2013.

## CAPÍTULO IV - PERSPECTIVAS

*Macrophomina phaseolina*, além das hidrolases lipolíticas extracelulares aqui estudadas em mais detalhe, produz outras hidrolases, cujo fracionamento com espuma poderá ser investigado com vistas a uma aplicabilidade industrial que não exija grande pureza. A purificação adicional dos espumados e posterior caracterização da(s) enzima(s) presente(s) poderá revelar novas aplicações para estes catalisadores naturais.

Os diversos isolados fúngicos estudados neste trabalho produziram, além dos complexos enzimáticos, pigmentos hidrossolúveis cujas propriedades bioquímico-farmacológicas poderão ser pesquisadas visando sua futura aplicação industrial.

O método utilizado neste trabalho poderá ser adequado para cada classe de produtos a ser pesquisada, especialmente quanto ao tipo de borbulhador, à composição e ao fluxo do gás, visando otimizar a recuperação e purificação das duas classes de biomoléculas.