

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS Campus de  
CAMPO GRANDE  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM - SBBq

LARISSA COSTA OLARTE

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA  
POLIGALACTURONASE PRODUZIDA POR *Aspergillus japonicus* E  
SUA APLICAÇÃO NA CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE FRUTAS**

Campo Grande, MS

MARÇO – 2020

LARISSA COSTA OLARTE

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA  
POLIGALACTURONASE PRODUZIDA POR *Aspergillus japonicus* E  
SUA APLICAÇÃO NA CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE FRUTAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.  
**Orientador:** Profª. Dra. Giovana Cristina Giannesi

Campo Grande, MS

MARÇO – 2020

TERMO DE APROVAÇÃO

LARISSA COSTA OLARTE

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA POLIGALACTURONASE  
PRODUZIDA POR *Aspergillus japonicus* E SUA APLICAÇÃO NA  
CLARIFICAÇÃO DE SUCO DE FRUTAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

13 de março de 2020

**Comissão Examinadora:**

---

Profa. Dra. Giovana Cristina Giannesi  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

---

Prof. Dr. Malson Neilson de Lucena  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Adriano e Edneia, que sempre acreditaram em mim. Nada disso seria possível sem o apoio de vocês.

Ao meu namorado, Bruno, por todo amor.

À minha orientadora, Giovana Giannesi, por toda atenção, compreensão, suporte e cafés nesses 2 anos de orientação. Muito obrigada pela confiança e por aceitar esse novo desafio que a pectinase foi dentro do laboratório.

A todos os professores e técnicos do laboratório, por contribuírem com o crescimento profissional dia após dia.

Aos amigos, Daniel e Rodrigo, que entraram junto comigo nessa. Obrigada pela assistência dentro e fora do laboratório. Pelos experimentos até 22h e também pelos fins de semana.

Aos amigos do laboratório, Aline, Amanda, Arthur, Isabela e Murilo, por “quebrar um galho” sempre que precisei, pelas horas de purificação, as artes, os gatinhos de Schrödinger, os almoços, os cafés sem fim e as risadas altas e sem cabimento.

Às minhas amigas Anna e Maria, que mesmo longe, sempre lembraram quão capaz e o quanto eu queria a pós-graduação.

À fonte financiadora, CAPES.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma e tornaram possível a conclusão desta etapa, muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/MEC-Brasil.

## RESUMO

Pectinases (EC 3.2.1.15) são enzimas que catalisam a hidrólise da pectina, um dos principais polissacarídeos da parede primária de plantas superiores. Fungos filamentosos, principalmente do gênero *Aspergillus*, são eficientes produtores de enzimas pectinolíticas. Dentre as pectinases, poligalacturonases têm sido extensivamente estudadas devido às suas potenciais aplicações, como por exemplo o, nas indústrias de alimentos, promovendo a clarificação de suco de frutas. Apesar das diversas aplicações industriais, o alto custo e a instabilidade, faz com que o uso comercial das enzimas permaneça limitado. A produção rápida e purificação de enzimas em poucas etapas é uma opção na superação desses obstáculos. O objetivo desse trabalho foi purificar e caracterizar uma exo-PGase produzida por *Aspergillus japonicus* e a clarificação de suco de frutas. Entre os 7 fungos testados, *A. japonicus* mostrou a melhor produção de PGase (0,389 U/mL) em meio líquido e purificação de 9,5 vezes com 103% de rendimento. A enzima apresentou um peso molecular de aproximadamente de 34 kDa (SDS-PAGE). O pH e a temperatura ótima para atividade da enzima foi 5,0 e 55 °C, respectivamente. A 50°C a enzima apresentou meia vida após 10 min. Em pH 6,0 manteve-se estável durante 2h. Os íons CuSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub> e HgCl<sub>3</sub> inibiram totalmente a atividade na concentração de 5mM. Em relação ao substrato, a PGase mostrou maior especificidade (8,81 U/mL) para pectina de maçã. A enzima foi classificada como exo-poligalacturonase por cromatografia em camada delgada de sílica. O suco tratado com a enzima purificada (2 U/mL) proporcionou um aumento de 95,7%, 85,7% e 35,5% na clarificação da manga tommy, manga keitt e laranja, respectivamente. A PGase de *A. japonicus* mostra potencial para ser aplicada na clarificação de suco de frutas.

**Palavras-chave:** *Aspergillus*. Poligalacturonase. Clarificação de sucos.

## ABSTRACT

Pectinases (EC 3.2.1.15) are enzymes that catalyze the hydrolysis of pectin, one of the main polysaccharides in the primary wall of superior plants. Filamentous fungi, mainly of the *Aspergillus* genus, are efficient producers of pectinolytic enzymes. Among pectinases, polygalacturonases have been extensively studied due to their applications, such as in the food industries, promoting a clarification of fruit juice. Despite various industrial applications, the high cost and instability mean that the commercial use of enzymes remains limited. The rapid production and purification of enzymes in a few steps is an option in overcoming these obstacles. The aim of this work was to purify and characterize an exo-PGase produced by *Aspergillus japonicus* and the clarification of fruit juices. Among the 7 fungi tested, *A. japonicus* showed a better production of PGase (0.389 U/mL) in the liquid medium and purification of 9.5 fold with 103% yield. The enzyme had a molecular weight of approximately 34 kDa (SDS-PAGE). The pH and the ideal temperature for the enzyme activity were 5.0 and 55°C, respectively. At 50° C, the enzyme showed half life after 10 min. At pH 6.0, it remained stable for 2 hours. The CuSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub> and HgCl<sub>3</sub> ions totally inhibited the activity of the enzyme at the concentration of 5mM. In relation to the substrate, the PGase showed greater specificity (8.81 U/mL) for apple pectin. The enzyme was classified as exo-PGase by thin layer chromatography on silica. The juice treated with a purified enzyme (2 U/mL) showed an increase of 95.7%, 85.7% and 35.5% in the clarification of the tomy mango, keitt mango and orange, respectively. The purified from *A. japonicus* has potential to be applied in the clarification of fruit juice.

**Keywords:** *Aspergillus*. Polygalacturonase. Juice clarification.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura da pectina.....	17
<b>Figura 2.</b> Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação sobre substâncias pécnicas.....	20
<b>Figura 3.</b> Curva de produção enzimática a partir do fungo <i>A. japonicus</i> em farelo de trigo 1% como fonte de carbono.....	32
<b>Figura 4.</b> Influência da temperatura na atividade pectinolítica do extrato bruto de <i>A. japonicus</i> .....	33
<b>Figura 5.</b> Influência do pH na atividade pectinolítica do extrato bruto de <i>A. japonicus</i> .....	33
<b>Figura 6.</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%).....	35
<b>Figura 7.</b> Influência da temperatura na atividade pectinolítica purificada de <i>A. japonicus</i> .....	36
<b>Figura 8.</b> Influência do pH na atividade pectinolítica purificada de <i>A. japonicus</i> .....	37
<b>Figura 9.</b> Efeito da termoestabilidade na atividade da PGase de <i>A. japonicus</i> .....	38
<b>Figura 10.</b> Efeito da variação do pH na estabilidade da PGase de <i>A. japonicus</i> .....	39
<b>Figura 11.</b> Análise dos produtos de hidrólise usando PGase em CCD.....	42

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Produção pectinolítica em condição submersa. ....	31
<b>Tabela 2.</b> Purificação da PGase de <i>A. japonicus</i> . ....	34
<b>Tabela 3.</b> Efeito de íons e EDTA na atividade da PGase de <i>A. japonicus</i> . ....	40
<b>Tabela 4.</b> Especificidade do substrato da PGase de <i>A. japonicus</i> . ....	41
<b>Tabela 5.</b> Clarificação do suco de frutas PGase de <i>A. japonicus</i> . ....	43

## Lista de Abreviaturas e Siglas

BDA	Batata-dextrose-ágar
CCD	Cromatografia em camada delgada
CMC	Carboximetilcelulose
DEAE	Dietilaminoetil
DNS	Ácido-3,5-dinitrosalicílico
EC	<i>Enzyme comission</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Reconized as Safe</i>
HG	Homogalacturonana
kDa	Quilodaltons
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PE	Pectinesterase
PGase	Poligalacturonase
PGL	Pectato liase
PL	Pectina liase
PMG	Polimetilgalacturonase
RG I	Ramnogalacturonana I

RG II	Ramnogalacturonana II
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
U	Unidade de enzima

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1 Substâncias pécticas.....	15
2.2 Enzimas pectinolíticas .....	18
Esterases.....	18
Hidrolases .....	18
Liases.....	19
2.3 Pectinases microbianas.....	21
2.4 Aplicações das pectinases microbianas .....	22
2.4.1 Clarificação de sucos de frutas .....	22
2.5 Purificação e caracterização de enzimas pectinolíticas .....	23
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos .....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
4.1 Linhagens e manutenção em meio sólido.....	26
4.2 Seleção dos fungos produtores de PGase em meio líquido.....	26
4.3 Atividade pectinolítica e quantidade proteica.....	26
4.4 Curva de produção enzimática .....	27
4.5 Purificação da PGase produzida pelo <i>A. japonicus</i> .....	27
4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante .....	27
4.7 Caracterização enzimática do extrato bruto e enzima purificada .....	28
4.8 Efeito do pH e temperatura na estabilidade da enzima .....	28
4.9 Efeito de íons e EDTA.....	28
4.10 Especificidade da PGase ao substrato.....	28
4.11 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	29
4.12 Clarificação do suco de frutas pela PGase de <i>A. japonicus</i> .....	29
4.13 Reprodutibilidade dos resultados.....	29

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>5.1</b> Caracterização bioquímica do extrato bruto de <i>A. japonicus</i> .....	<b>31</b>
<b>5.2</b> Purificação da PGase produzida por <i>A. japonicus</i> .....	<b>34</b>
<b>5.3</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	<b>35</b>
<b>5.4</b> Caracterização enzimática da PGase purificada de <i>A. japonicus</i> .....	<b>36</b>
<b>5.5</b> Efeito do pH e temperatura na estabilidade da enzima .....	<b>38</b>
<b>5.6</b> Efeito de íons e EDTA na atividade da enzima purificada .....	<b>40</b>
<b>5.7</b> Especificidade da PGase purificada ao substrato .....	<b>41</b>
<b>5.8</b> Cromatografia em camada delgada (CCD).....	<b>41</b>
<b>5.9</b> Clarificação do suco de frutas pela PGase de <i>A. japonicus</i> .....	<b>43</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os sucos de frutas são naturalmente turvos, mas em diferentes graus, principalmente devido à presença de polissacarídeos (pectina, celulose, hemiceluloses e amido), lignina, proteínas, taninos e metais. Como a aparência clara do suco é um fator determinante para os consumidores, a indústria de suco de frutas vem investindo em métodos que otimizam esse recurso. A alta concentração de pectina leva à formação de colóides, que constitui um dos principais problemas durante o processamento de sucos de frutas transparentes. Embora as partículas suspensas da polpa possam ser removidas por filtração, a presença de pectina pode dificultar esse método.

A despectinização de sucos de frutas através do uso de pectinases tem sido apresentada como uma alternativa eficiente para reduzir a turbidez. As pectinases degradam a pectina, resultando em redução da viscosidade e formação de aglomerados, o que facilita a separação por centrifugação ou filtração. Como resultado, o suco apresenta maior clareza, além de sabor e cor mais concentrados.

As enzimas pectinolíticas, ou pectinases, podem ser classificadas em esterases, hidrolases e liases, atuando de diferentes formas em seu substrato, a pectina. Representam cerca de 75% das vendas globais de enzimas comercializadas na indústria de alimentos. Seu uso desempenha um papel importante na melhoria da qualidade dos produtos, aumentando a taxa de extração e clarificação de certos sucos de frutas, bem como na extração de óleos vegetais, como o azeite, a estabilização de produtos e a melhoria do sabor. São usadas também na indústria têxtil e bio-lavagem de fibras de algodão. Até agora, as pectinases industriais podem ser produzidas a partir de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, especialmente do gênero *Aspergillus*.

Dentre as hidrolases, as PGases são as enzimas pectinolíticas mais estudadas e as mais utilizadas em produtos comerciais. As PGases estão presentes em plantas, bactérias, leveduras, fungos filamentosos e podem até ser encontradas em nematóides e insetos. Eles catalisam a clivagem das ligações  $\alpha$ -1,4 do ácido poligalacturônico e das regiões homogalacturônicas das pectinas. Podem ser classificadas em endo-PGases, realizando a hidrólise no interior da cadeia, ou exo-PGases, quando realizam a hidrólise da porção externa da cadeia. Sabendo do grande destaque do uso biotecnológico destas

enzimas, o objetivo deste trabalho foi purificar, caracterizar e aplicar na clarificação de suco de frutas uma nova PGase produzida por *A. japonicus*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Substâncias pécticas

Substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas complexas de alto peso molecular encontradas em plantas superiores (Pan et al., 2015). Estão presentes na parede celular primária e são os principais componentes da lamela média (Aspinall, 1970; Pan et al., 2015), uma fina camada adesiva formada entre as paredes das células jovens adjacentes, dando rigidez à planta (Rombouts & Pilnik, 1980; Alkorta et al., 1998), promovendo a adesão de lignina e outros polissacarídeos como celulose e hemicelulose na parede celular (Srinrangarajan & Shrikhande, 1979), defesa contra patógenos (Lingxia & Steven, 2010) e ao estresse biótico gerados por plantas parasitas (de Lima Damasio et al., 2010; Bonnin et al., 2014).

Estruturalmente, pectinas são compostas por uma longa cadeia primária formada por unidades (1→4)- $\alpha$ -D-ácido galacturônico, entretanto esta cadeia é interrompida em 2 a 4% de unidades de (1→4)- $\beta$ -galacturonato e (1→2)- $\alpha$ -L-ramnose, às quais estão ligadas cadeias laterais de açúcares neutros, unindo moléculas de pectina à matriz polissacarídica da parede celular vegetal (Whitaker, 1990; Hwang & Kokini, 1992; Rangarajan et al., 2010). Os grupos carboxílicos do ácido galacturônico podem ser esterificados por grupos metila e parcialmente ou completamente neutralizados por íons sódio, potássio ou amônio (Be Miller, 1986). Quando ocorre essa modificação na cadeia principal, as substâncias pécticas podem ser classificadas em três grandes grupos, todos contendo ácido D-galacturônico em maior ou menor grau (Ridley et al., 2001; Wikiera et al., 2015).

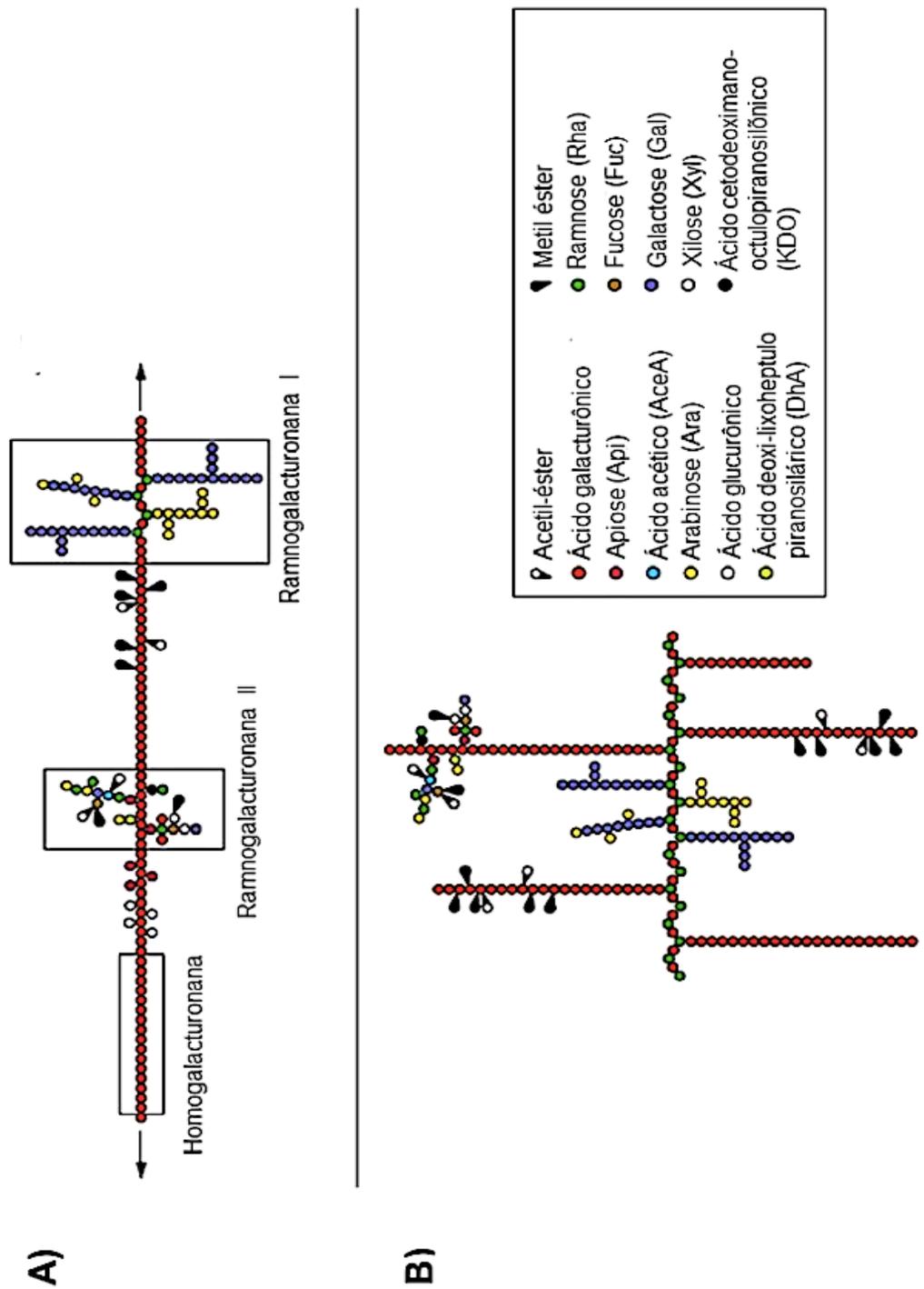
A homogalacturonana (HG) é um polímero linear formado por ácido D-galacturônico que pode ser acetilado e/ou metil esterificado. A molécula é classificada de acordo com o seu nível de esterificação: protopectina, substâncias pécticas insolúveis em água, sofrem hidrólise resultando em pectina e pectinas ácidas; o ácido pectínico que tem menos de 75% dos grupos esterificados; ácido péctico ou ácido poligalacturônico contendo quantidades insignificantes de grupos metoxil; e pectina, frequentemente a palavra é usada como um nome genérico para substâncias pécticas, onde o ácido pectínico é o maior componente, tendo pelo menos 75% dos grupos esterificados (Jayani et al., 2005).

Já a ramnogalacturonana I (RGI) é composta pela sucessão do dissacarídeo ramnose – ácido galacturônico. Os resíduos galacturônicos podem ser acetilados e ambos podem conter cadeias laterais de açúcares neutros como galactose, arabinose e xilose. O polímero estruturalmente mais complexo é a ramnogalacturonana II (RGII), que apesar de seu nome, RGII é também uma cadeia HG, apresentando, no mínimo, oito unidades monoméricas, com cadeias laterais complexas ligadas aos resíduos galacturônicos (Willats et al., 2006; Sharma et al., 2013; Wikiera et al., 2015).

Estudos recentes já permitiram esquematizar estruturas hipotéticas da pectina, com pequenas modificações de acordo com novas descobertas (Canteri et al., 2012). Até recentemente, era aceito que HG e RGI constituíam a espinha dorsal dos polímeros pécticos, como mostrado na Figura 1 (A). No entanto, foi proposta uma estrutura alternativa na qual HG é uma longa cadeia lateral de RGI (Figura 1 (B)). Os comprimentos das cadeias laterais podem variar consideravelmente e a composição de açúcar de RGI também pode ser altamente heterogênea. Por outro lado, acredita-se que RGII tenha sua estrutura altamente conservada (Willats et al., 2006).

Quando HG formam uma rede cristalina tridimensional na qual a água e os solutos estão aprisionados, substâncias pécticas tendem a formar uma estrutura em gel. Vários fatores são responsáveis pela gelificação, incluindo tipo de pectina, grau de esterificação, grau de acetilação, temperatura, pH, açúcar e a presença de outros solutos (Willats et al., 2006). Por ser viscosa, gelificante e ter propriedades de estabilização, a pectina é utilizada em uma série de aplicações na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos (Karakı et al., 2016).

As substâncias pécticas estão presentes em várias formas nas células vegetais e segundo Jayani et al. (2005), a pectina forma de 0,5 a 4% do peso úmido da fruta, sendo abundante em cascas de frutas cítricas, e esta é a provável razão para a existência de numerosas formas de enzimas pectinolíticas, sendo essas de importância primordial por auxiliarem na extensão da parede celular vegetal e no amolecimento de alguns tecidos vegetais durante o amadurecimento e estocagem. Elas também intervêm no balanço ecológico, mediante processos de decomposição e reciclagem de resíduos vegetais (Murad & Azzaz, 2011).



**Figura 1.** Estrutura da pectina. Representação esquemática da convencional (A) e da estrutura alternativa proposta (B). (Modificada Willats et al., 2006).

## 2.2 Enzimas pectinolíticas

As pectinases são amplamente encontradas na natureza (Zeni et al., 2011), 50% são produzidas a partir de fungos e leveduras, 35% a partir de bactérias, enquanto os 15% restantes são de origem animal ou vegetal (Garg et al., 2016). Um grande número de cepas bacterianas, principalmente *Bacillus* spp., leveduras (*Yarrowia lipolytica* e *Saccharomyces cerevisiae*), e muitos fungos filamentosos, como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. sojae*, *Trichoderma viridiae*, *T. virens* e *Penicillium griseoroseum* são potenciais produtores de pectinases (Martin et al., 2004; Favela-Torres et al., 2006; Tari & Tokatli, 2007; Teixeira et al., 2011; Benoit et al., 2012; Ruiz et al., 2012). De acordo com o mecanismo de ação sobre a molécula de pectina, estas enzimas podem ser divididas em 3 grupos distintos que são classificadas e nomeadas de acordo com a “Enzyme Commission” (EC) (Figura 2), segundo as recomendações da International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUPAC-IUB3; as esterases e as despolimerases (hidrolases e liases) (Kashyap et al., 2001).

### Esterases

A pectina esterase (polimetilgalacturonato esterase, PMGE) (EC 3.1.1.11) catalisa a hidrólise dos grupos metil éster da pectina, liberando metanol e convertendo pectina em pectato (polímero não estereificado) (Shen et al., 1999; Gummadi & Panda, 2003; Jayani et al., 2005). Apresenta valores de pH ótimo variando de 4 a 8 e temperatura ótima de 40 a 50°C (Jayani et al., 2005).

### Hidrolases

Incluem as polimetilgalacturonases e as poligalacturonases (EC 3.2.1.15). A polimetilgalacturonase (PMG) hidrolisa polimetil-galacturonatos a oligometilgalacturonatos por clivagem de ligações  $\alpha$ -1,4, podendo ser endo- ou exo-PMG (Kayshap et al., 2001).

As poligalacturonases (PGases) hidrolisam ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 entre dois resíduos de ácido galacturônico (Mutlu et al., 1999). É a mais comum enzima do grupo das pectinases com função hidrolítica, podendo apresentar ação endo- (hidrólise randômica) ou exo- (hidrólise sequencial) do ácido péctico (Kayshap et al., 2001; Jayani et al., 2005). As PGases fúngicas são de interesse biotecnológico pela alta atividade

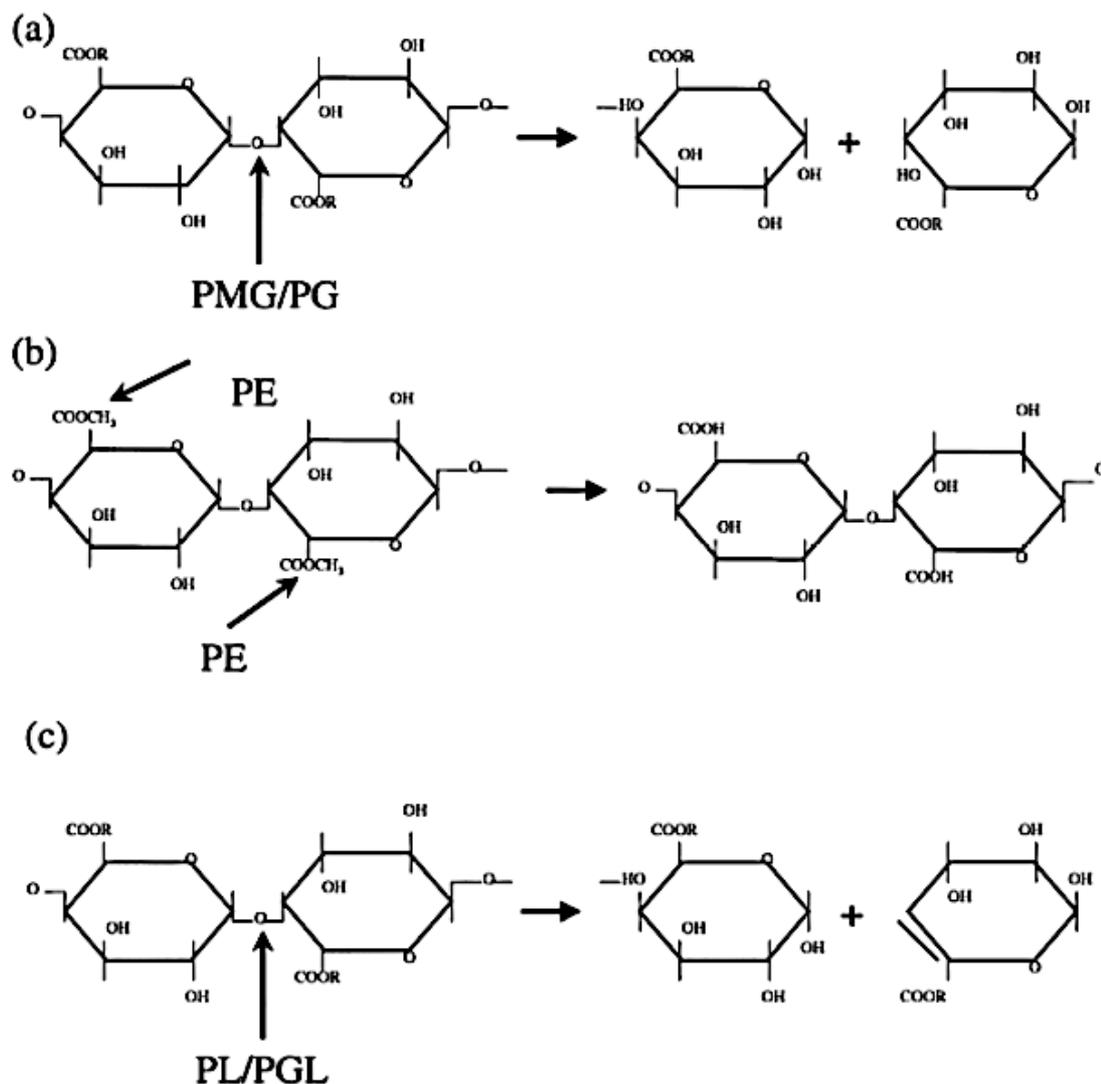
enzimática e por possuírem pH ótimo de atividade na região levemente ácida e temperatura ótima entre 30 e 50°C (Zheng & Shetty, 2000; Jayani et al., 2005).

### **Liases**

Também chamadas como transeeliminases, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado (Kayshap et al., 2001; Jayani et al., 2005) e incluem as pectina liases e as pectato liases.

As pectina liases (polimetilgalacturonato liase, PMGL) (EC 4.2.2.10) catalisam a  $\beta$ -eliminação entre dois resíduos de ácido galacturônico mais ou menos esterificados. Quebram as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos das posições 4 e 5 da pectina (Gainvors et al., 1994; Whitaker, 1994; Karam & Belarbi, 1995) de modo endo- ou exo-. O pH ótimo é em torno de 5,5 (Mayans et al., 1997) e temperatura ótima entre 40 e 50°C (Jayani et al., 2005).

O pectato liase (poligalacturonato liase, PGL) (EC 4.2.2.2) catalisa a clivagem de ligações  $\alpha$ -1,4 de ácido péctico de modo endo- ou exo- por transeliminação (Kayshap et al., 2001), requer  $\text{Ca}^{2+}$  para atividade e tem pH ótimo na região alcalina, entre 7,5 e 10 e temperatura ótima entre 40 e 50°C (Sakai et al., 1993; Mayans et al., 1997; Jayani et al., 2005).



**Figura 2.** Diferentes tipos de pectinases e seus modos de ação sobre substâncias pécnicas. (a) R = H para PG e CH<sub>3</sub> para PMG, (b) PE e (c) R=H para PGL e CH<sub>3</sub> para PL. A seta indica o lugar onde as pectinases atuam sobre as substâncias pécnicas. PG: poligalacturonase, PMG: polimetilgalacturonase, PE: pectinesterase, PGL: pectato liase, PL: pectina liase (Gummadi & Panda, 2003).

Estas enzimas apresentam grande destaque nos processos industriais já sua produção demanda baixo consumo energético, aceleram processos bioquímicos, possuem baixa toxicidade e são altamente específicas. Também são capazes de alterar

as características de diversos resíduos sem o uso de altas temperaturas, solventes orgânicos e condições de pH (Cherry & Fidantsef, 2003; Mussatto, 2007).

### 2.3 Pectinases microbianas

O isolamento e as técnicas de *screening* de microrganismos produtores de pectinases são de extrema importância para atender a demanda e o aumento de suas aplicações biotecnológicas. Vários estudos foram realizados para a produção de pectinases a partir de diferentes fontes de carbono, como farelo de trigo (Taragano et al., 1997), bagaço de cana (Solis-Pereyra et al., 1993, 1996) casca de limão (Larios et al., 1989), casca de laranja (Grhomann & Baldwin, 1992) e polpa do tomate (Sharma & Gupta, 2001). O uso de microrganismos para a produção de enzimas é economicamente viável, desenvolvendo assim suas aplicações industriais (Padma et al., 2011; Torres et al., 2011; Dey & Banerjee, 2014).

Enzimas microbianas são mais ativas e estáveis que enzimas de plantas e animais. No entanto, pectinases fúngicas possuem propriedades especiais como adaptabilidade à temperatura e pH ótimo na faixa de 3,0 - 5,0 (Siddiqui et al., 2012; Cheng et al., 2016). Entre os fungos filamentosos, os principais produtores de pectinases são dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium*. Destas linhagens, *A. niger* tem atraído a maior atenção como produtor de pectinase devido à sua longa história nas indústrias de fermentação e seu status como um organismo geralmente considerado seguro (GRAS), de acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos (Iwashita, 1989). O gênero *Aspergillus* representa anamorfos pertencentes à família Trichocomaceae, ordem Eurotiales, subclasse Eurotiomycetidae, classe Eurotiomycetes e ao filo Ascomycota, representando 838 epítetos (Hu et al., 2011). Amplamente distribuídos na natureza, podem ser isolados de uma variedade de substratos ou ambientes como, ar, solo, plantas e matéria orgânica em decomposição. Isso se deve à fácil dispersão dos conídios<sup>1</sup> e seu tamanho relativo, sendo suspensos no meio por um longo período de tempo (Warnock et al., 1999; Abarca, 2000). Fungos do gênero *Aspergillus* têm sido escolhidos para processo de larga escala por serem capazes de produzir grandes variedades e quantidades de enzimas em meios de baixo custo (Bergquist et al., 2002). Com potencial na produção de enzimas, especificamente

---

<sup>1</sup> Conídios: forma mais comum de reprodução assexuada dos fungos.

pectinases, são relatados *A. niger* (Sanjay Kumar et al., 2011), *A. giganteus* (Pedrolli et al., 2008; Ortiz et al., 2017), *A. japonicus* (Li et al., 2015), *A. awamori* (Dey & Banerjee, 2014), *A. foetidus* (Sunil Kumar et al., 2015), *A. fumigatus* (Phutela et al., 2005), *Aspergillus tamarii* (Shanmugavel et al., 2018).

## 2.4 Aplicações das pectinases microbianas

É importante ressaltar que enzimas pectinolíticas compõem cerca de 25% do mercado mundial de enzimas alimentares (Trindade et al., 2016; Amin et al., 2017), tendo assim um amplo espectro de aplicações (Garg et al., 2016; Shet et al., 2018), como no processamento de têxteis e biolavagem de fibras de algodão, juntamente com amilases, lipases, celulasas e hemicelulasas, removendo agentes de colagem do algodão de maneira segura e ecológica, substituindo a soda cáustica (Rebello et al., 2017). São Utilizadas no pré-tratamento de águas residuais oriundas das indústrias de processamento vegetais, facilitam a remoção do material pectináceo e o torna adequado para decomposição por tratamento com lodo ativado (Hoondal et al., 2002).

O tratamento enzimático também acelera a fermentação do chá, embora a dose da enzima deva ser ajustada cuidadosamente para evitar danos à folha. A adição de pectinase também melhora a propriedade de formação de espuma dos pós de chá instantâneos, pela degradação das pectinas. Diminuem a viscosidade da ração animal e aumentam a absorção de nutrientes pelos ruminantes (Kumar & Suneetha, 2014). As pectinases extraem óleos de colza (canola), semente de girassol, palma e azeitona, evitando o uso do hexano, potencial agente carcinogênico (Ortiz et al., 2017). Em conjunto com  $\beta$ -glucanases e hemicelulasas, têm sido utilizadas na produção de vinho promovendo uma melhor maceração da casca e aumento da extração de pigmentos, facilitando a clarificação e filtração do mosto<sup>2</sup> e aumentando a qualidade e estabilidade do vinho (Revilla & Gonzalez-San José, 2003).

### 2.4.1 Clarificação de sucos de frutas

A principal aplicação industrial de pectinases é na extração e clarificação de suco de frutas. O esmagamento mecânico dos frutos, ricos em pectina, resulta em um purê de frutas altamente viscoso, do qual é difícil extrair suco, já que o esmagamento

---

<sup>2</sup> Mosto: sumo de uvas frescas que não tenham passado pelo processo de fermentação.

dos tecidos faz com que o suco permaneça ligado à polpa, formando uma massa gelificada (Pifferi et al., 1989). De acordo com as propriedades físicas e químicas de cada fruta, seus sucos apresentam diferentes graus de turbidez natural. A turbidez do suco ocorre devido à presença de materiais insolúveis, como fragmentos celulares originários de seu tecido e/ou componentes que não são totalmente dissolvidos. A pectina, então, se divide entre a fase líquida e as partículas da polpa, causando um aumento da viscosidade e facilitando a retenção de água (Lanzarini et al., 1989). Um dos principais problemas encontrados na preparação de sucos de frutas é a turbidez devido principalmente à presença de pectinas. Para melhorar o rendimento do suco com alta qualidade aromática, em um curto tempo de processamento, e aumentar sua qualidade nutricional, reduzindo a quantidade de resíduos, é necessário degradar a pectina. Além de promover a extração do suco, a adição de enzimas aumenta a liberação de vários compostos fenólicos e outros componentes nutricionalmente importantes (Markham et al., 2000).

Por esse motivo, a adição de enzimas pectinolíticas à polpa do fruto antes da prensagem é um pré-requisito para obter um rendimento satisfatório. A despectinização depende da composição do suco, do tipo de enzima utilizada e do tempo consumido para clarificação (Alkorta et al., 1998; Versari et al. 1998). Para a melhor despectinização e clarificação de sucos (laranja, maçã, pêra, uvas, goiaba, banana, mamão, cenoura, beterraba) usando pectinase, devem ser consideradas, em geral, as condições ótimas da enzima como: pH em torno de 2,5 - 6,0 (Soares et al., 2001; Croak & Corredig, 2006), o tempo de tratamento de 5 minutos a 6 horas (Soares et al., 2001; Tochi et al., 2009; Aliaa et al., 2010), e a faixa de temperatura em torno de 50°C (Kashyap et al., 2001; Soares et al., 2001; Aliaa et al., 2010).

## **2.5 Purificação e caracterização de enzimas pectinolíticas**

As enzimas pectinolíticas ácidas de *Aspergillus* sp, possuem um extenso âmbito de aplicações, porém o extrato bruto obtido após o cultivo em meio líquido contém uma mistura de metabólitos, que não garante que a degradação do substrato se deve à ação da enzima desejada ou de um complexo multienzimático em sinergia, assim, o processo auxiliar essencial é a purificação da enzima alvo antes da aplicação comercial específica (Aikat, Maiti & Bhattacharyya, 2001). A seleção do número mínimo de etapas de

separação com alta atividade específica e/ou pureza e alta recuperação é recomendada para a aplicação de custo efetivo da enzima purificada.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Selecionar fungos filamentosos produtores de PGases: Caracterizar, purificar e utilizar a enzima na clarificação de suco de frutas

#### 3.2 Objetivos específicos

- I. Testar a produção de PGase utilizando sete fungos filamentosos (*Aspergillus terreus*, *Aspergillus japonicus*, *Cladosporium* sp., *Trichoderma virens*, *Aspergillus* sp., *Aspergillus flavus* e *Penicillium funiculosum*);
- II. Estudar a influência de fontes de carbono na produção do complexo pectinolítico;
- III. Caracterizar tempo de produção enzimática, pH e temperatura ótima a partir do melhor produtor;
- IV. Purificar a PGase através de processos cromatográficos;
- V. Estimar a massa molecular por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE);
- VI. Realizar a caracterização bioquímica da PGase purificada (pH, temperatura, estabilidade, efeito de íons e EDTA, especificidade ao substrato e CCD) sobre a atividade e estabilidade enzimática;
- VII. Avaliar o efeito da PGase purificada na clarificação de sucos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Linhagens e manutenção em meio sólido

Foram utilizados 7 fungos os quais já foram isolados pela técnica do laboratório Clarice Rossato Marchetti e, estão mantidos na Micoteca da UFMS/Campo Grande – MS, as espécies utilizadas foram: *Aspergillus terreus*, *Aspergillus japonicus*, *Cladosporium* sp., *Trichoderma virens*, *Aspergillus* sp., *Aspergillus flavus* e *Penicillium funiculosum*. Os fungos foram mantidos em tubos de ensaio em meio BDA (batata-dextrose-ágar) com ágar de superfície inclinada, a 30°C, por um período de 7 dias. Posteriormente, levados a geladeira até o momento de uso.

### 4.2 Seleção dos fungos produtores de PGase em meio líquido

Os fungos foram crescidos em meio líquido (Rizatti et al., 2001) com modificações contendo K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4%, peptona 0.2%, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.02%, CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O 0.0001%, FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O 0.0004%, com diferentes fontes de carbono (Carboximetilcelulose (CMC) 1%, bagaço de cana 1%, CMC 1% + bagaço de cana 1%, CMC 0,5% + bagaço de cana 0,5%, Avicel 1%, Avicel 1% + CMC 1%, Avicel 0,5% + CMC 0,5%, farelo de trigo 1%, farelo de trigo 1% + CMC 1%, farelo de trigo 0,5% + CMC 0,5%, glicose 1%, glicose 1% + CMC 1% e glicose 0,5% + CMC 0,5%). Para inoculação foram utilizados Erlenmeyer de 25 mL por meio de suspensão de esporos (5x10<sup>5</sup> esporos por mL), mantidos em agitação a 110 rpm, por um período de 96 horas a 30°C. Em seguida foi feita a filtração, para extração de enzimas extracelulares.

### 4.3 Atividade pectinolítica e quantidade proteica

A atividade da PGase foi detectada incubando a amostra a 45°C com tampão acetado de sódio pH 5,0 contendo 1% de pectina (Sigma P9135). Alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados, e para a formação do açúcar redutor liberado foi utilizado ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS) conforme o método de Miller (1959), com ácido galacturônico como açúcar padrão e então feita a leitura em absorbância a 540 nm. A atividade específica foi definida através da relação entre o número de unidades por miligrama de proteína (U/mg). A quantificação de proteínas foi realizada segundo o

método de Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

#### **4.4 Curva de produção enzimática**

Após definir o melhor produtor de PGase e a melhor fonte de carbono, o selecionado foi cultivado em meio líquido, conforme descrito no item 4.2, e alíquotas de 1mL foram retiradas diariamente num período variando de 24 a 168 horas para determinação do melhor tempo de crescimento e produção da enzima.

#### **4.5 Purificação da PGase produzida pelo *A. japonicus***

A purificação foi realizada com um volume de 100 mL da amostra aplicado em uma coluna de troca iônica (DEAE-celulose), previamente equilibrada com tampão Tris HCl 50 mM (pH 7,5). A amostra foi eluída com o mesmo tampão, coletada em frações de 3mL, e após 20 mL de eluição foi aplicado o gradiente linear de NaCl (0-1,0 M). O perfil de proteína foi determinado pela leitura das frações no comprimento de onda de 280 nm no espectrofotômetro. A atividade de PGase foi determinada conforme descrito no item 4.3. Frações correspondentes à PGase foram coletadas, dialisadas e concentradas. O grau de pureza das amostras foi analisado por eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).

#### **4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante**

Para visualizar a pureza e massa molar da amostra obtida após a etapa de purificação, foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme o método descrito por Laemmli (1970). As amostras foram preparadas na proporção de 1:1 em tampão de amostra (glicerol 20%, SDS 7%, azul de bromofenol 0,002%; em Tris-HCl 0,12 M, pH 6,8), na presença de 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol e aquecidas durante 5 min em água fervente. A eletroforese foi realizada sob 100 V em tampão Tris/glicina/SDS pH 8,3. Após a corrida, o gel foi fixado e corado com kit coloração em prata (Sigma – Aldrich).

#### **4.7 Caracterização enzimática do extrato bruto e enzima purificada**

As enzimas também foram avaliadas em relação à temperatura e ao pH de reação. Para determinar-se a temperatura ideal de reação foram realizados ensaios de atividade na faixa de 40 a 60°C para extrato bruto e 40 a 65°C para purificada, quanto ao pH ótimo de atividade foi avaliado utilizando-se tampão McIlvaine (pH 2,0 a 8,0), fixando-se as demais condições padronizadas para análise.

#### **4.8 Efeito do pH e temperatura na estabilidade da enzima**

A enzima purificada de *A. japonicus* foi avaliada quanto a sua estabilidade nas temperaturas de 50, 55 e 60°C, nos diferentes tempos de incubação 10, 20, 30, 40, 60 e 120 minutos. Quanto ao pH, a enzima foi incubada a 50°C nos tempos de reação 15, 30, 60 e 120 minutos, em tampão McIlvaine variando na faixa de 4,0 – 6,0. A estabilidade da atividade de PGase foi avaliada conforme previamente descrito no item 4.3. A atividade foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade correspondeu à atividade realizada em pH e temperatura ótima da enzima.

#### **4.9 Efeito de íons e EDTA**

Para avaliar o efeito dos íons metálicos, cloreto de amônio e EDTA na atividade enzimática, a enzima foi incubada com KCl, CuSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub>, HgCl<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>Cl e EDTA, separadamente, em concentrações finais de 1 e 5 mM por 30 minutos a 50°C, e a atividade residual de PGase foi quantificada conforme descrito no item 4.3. A atividade foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade correspondeu à atividade realizada na ausência de íons metálicos.

#### **4.10 Especificidade da PGase ao substrato**

A atividade foi avaliada sobre diferentes substratos em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) a 50°C por 30 minutos, utilizando-se como substrato ácido poligalacturônico (Sigma P3888) 1%, pectina cítrica (Sigma P9135) 1% e pectina de maçã (Sigma P93864) 1%.

#### 4.11 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A análise dos produtos obtidos pela hidrólise de ácido poligalacturônico, pectina cítrica e pectina de maçã, por ação da PGase, foram feitos em cromatografia ascendente em camada de sílica (CCD). A PGase foi incubada com os substratos em tampão acetato de sódio (pH 5,0), por um período de 24 h a 50°C. Em seguida, 5 µL foram aplicadas na placa de CCD, tendo o ácido galacturônico (Sigma 48280) como padrão, e o sistema de solvente foi constituído de n-butanol: água destilada: ácido acético (5:3:2; v/v). A revelação foi realizada através de borrifadas de uma solução contendo orcinol 0,2% dissolvido em metanol: ácido sulfúrico (9:1) (v/v), seguido de incubação em estufa a 100°C até o aparecimento das bandas.

#### 4.12 Clarificação do suco de frutas pela PGase de *A. japonicus*

Os frutos utilizados para os ensaios de clarificação foram manga tommy, manga keitt, nectarina, mangostim, laranja, mexerica e uva vitória. Todas as frutas foram adquiridas nos mercados e lavadas, descascadas e maceradas usando um liquidificador para obter a polpa. A polpa foi incubada com o extrato bruto ou enzima purificada na proporção de (1:1) a 50°C por 4h. Após esse período, as amostras foram fervidas por 5 min para inativação enzimática e centrifugadas a 21.000g por 15 min. O sobrenadante (suco) foi utilizado para determinar a clareza do suco, registrando a transmitância a 650 nm, tomando água destilada como branco. Para cada polpa de frutas, foi realizado um controle utilizando polpa de frutas e água destilada (1:1 v/v). A clarificação foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Clarificação} = \frac{T_t - T_c}{T_c} \times 100$$

( $T_t$  = transmitância do teste;  $T_c$  = transmitância do controle), conforme descrito por Rosmine et al. (2017).

#### 4.13 Reprodutibilidade dos resultados

Os resultados obtidos e mostrados representam as médias de 2 experimentos independentes  $\pm$  o desvio padrão.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sete linhagens de fungos foram utilizadas para selecionar o melhor produtor de PGase. *Aspergillus terreus*, *Cladosporium sp.* e *Trichoderma virens* apresentaram uma produção de 0,122, 0,132 e 0,118 (U/mL), respectivamente, em farelo de trigo 1% como fonte de carbono. Quanto ao *Penicilium funiculosum* não houve qualquer produção enzimática em farelo de trigo (Tabela 1).

Dentre as 13 fontes de carbono, *A. flavus* obteve a maior produção (0,188 U/mL) em glicose 1% como fonte de carbono. *A. japonicus* apresentou a maior produção enzimática (0,389 U/mL) comparado com os outros fungos em estudo, sendo o farelo de trigo a melhor fonte de carbono indutora de enzimas pectinolíticas, seguida por CMC 1% + farelo de trigo 1% (0,387 U/mL). Assim, esta linhagem foi usada nos processos de caracterização e purificação, com o objetivo de aplicar a enzima na clarificação de sucos.

**Tabela 1.** Produção pectinolítica em condição submersa.

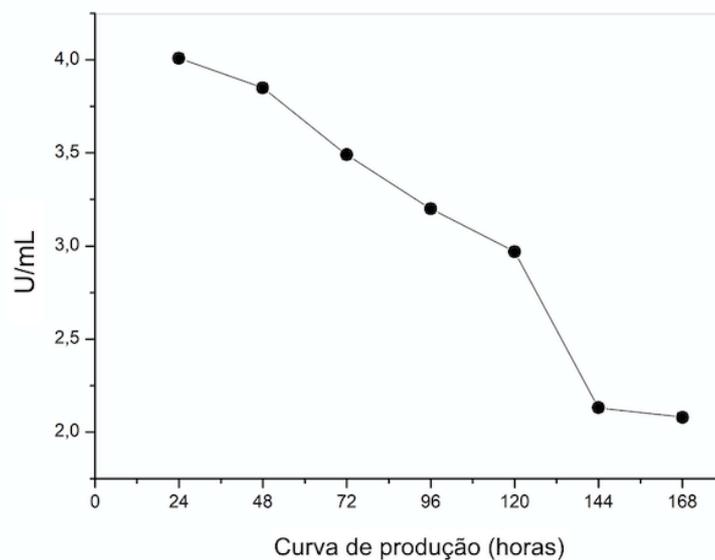
	<i>A. terreus</i>	<i>A. japonicus</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>T. virens</i>	<i>Aspergillus sp</i>	<i>A. flavus</i>	<i>P. funiculosus</i>
<b>CMC 1%</b>	0,1	0,076	0,038	0,037	0,031	0,024	0,023
<b>Bagaço de cana 1%</b>	0,077	0,075	0,025	0,047	0,056	0,033	0,012
<b>CMC 1% + Bagaço de cana 1%</b>	0,242	0,074	0,1	0,037	0,046	0,016	0,024
<b>CMC 0.5% + Bagaço de cana 0.5%</b>	0,084	0,042	0,045	0,097	0,029	0,013	0,029
<b>Avicel 1%</b>	0,060	0,024	-	0,152	0,064	0,045	0,033
<b>CMC 1%+ Avicel 1%</b>	0,273	0,107	0,097	0,040	0,038	0,031	0,044
<b>CMC 0.5% + Avicel 0.5%</b>	0,198	0,019	0,084	0,034	0,037	0,021	0,092
<b>Farelo de trigo 1%</b>	0,122	0,389	0,132	0,118	0,088	0,048	-
<b>CMC 1% + Farelo de trigo 1%</b>	0,287	0,387	0,093	0,183	0,146	0,023	-
<b>CMC 0.5% + Farelo de trigo 0.5%</b>	0,119	0,348	0,074	0,128	0,095	0,017	-
<b>Glicose 1%</b>	0,023	0,215	0,046	0,119	0,046	0,188	0,034
<b>CMC 1% + Glicose 1%</b>	0,053	0,252	0,082	0,138	0,063	0,175	0,025
<b>CMC 0.5% + Glicose 0.5%</b>	0,071	0,072	0,087	-	0,033	0,036	-

Os resultados estão apresentados em U/mL; (-) atividade não detectada.

### 5.1 Caracterização bioquímica do extrato bruto de *A. japonicus*

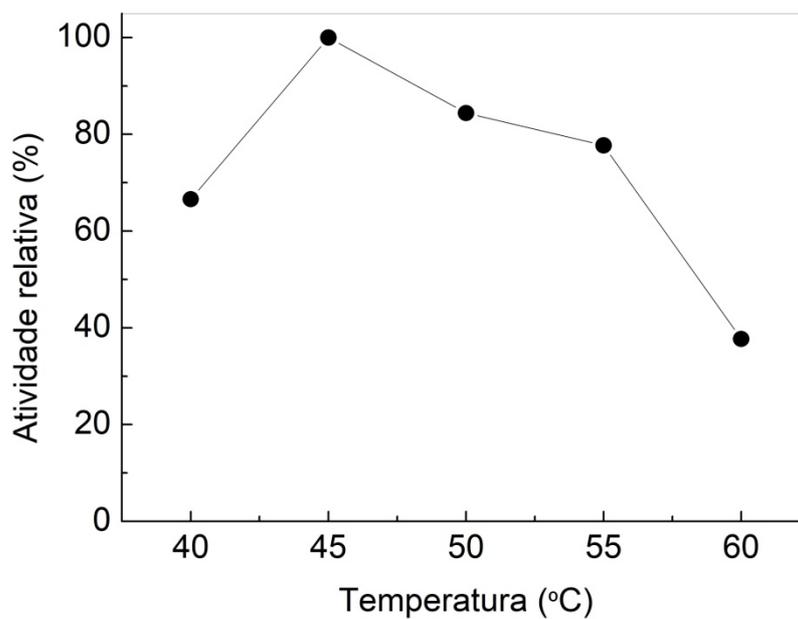
*Aspergillus* possuem inúmeras características que os tornam ideais para aplicações industriais, como boa capacidade de fermentação e elevados níveis de produção de enzimas capazes de degradar polissacarídeos da parede celular vegetal, as quais são de grande importância para a indústria alimentícia (Mohnen, 2008). *A. japonicus* apresentou um pico de produção enzimática (4 U/mL), em 24h de crescimento, decaindo em tempos maiores, sendo este um bom resultado para possíveis

aplicações biotecnológicas (Figura 3). De Carvalho Silva et al. (2018), relatam atividade de uma PGase de 2,72 U/mL para *A. japonicus*, 3,94 U/mL para *A. niger*, 3,45 U/mL para *A. tamarii*, 3,44 U/mL para *A. niger* e 3,87 U/mL para *A. aculeatus*.

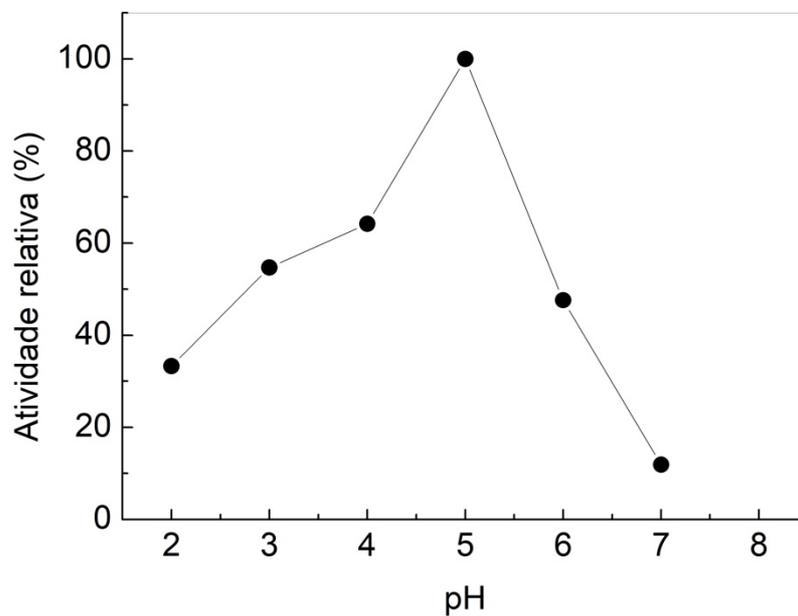


**Figura 3.** Curva de produção enzimática a partir do fungo *A. japonicus* em farelo de trigo 1% como fonte de carbono.

Nas figuras 4 e 5, estão apresentados as curvas de temperatura e pH onde pode-se observar temperatura e pH ótimos do extrato bruto. A temperatura ótima foi 45°C, decaindo 15,6% a 50°C (Figura 4). A enzima apresentou um aumento linear na atividade em pH variando de 2,0 a 4,0, tendo pH 5,0 como ótimo, e decaindo para 40% e 10% em pH 6,0 e 7,0, respectivamente (Figura 5).



**Figura 4.** Influência da temperatura na atividade pectinolítica do extrato bruto de *A. japonicus*. Atividade enzimática foi avaliada em intervalos de temperatura variando de 40 a 60°C, conforme descrito no item 4.7.



**Figura 5.** Influência do pH na atividade pectinolítica do extrato bruto de *A. japonicus*. Atividade enzimática foi avaliada em intervalos de pH variando de 2,0 a 7,0, conforme descrito no item 4.7

Segundo Yadav et al. (2008), PGases produzidas por *A. sojae* possuem pH ótimo 5,5, *A. japonicus* pH 6,0 e temperatura ótima 55°C, *A. oryzae* 40°C, *A. niger* pH 5,5 e 35°C, *A. flavus* pH 8,0 e 50°C e *A. ficuum* pH 5,0 e 50°C.

Pectinases ácidas são usadas para clarificação do suco de frutas por removerem substâncias pécicas pela hidrólise dos polissacarídeos da lamela média, e atuarem na faixa de pH 3,0 - 6,0 e temperaturas variando de 35 a 60°C (Cheng et al., 2016; Wang et al., 2017).

## 5.2 Purificação da PGase produzida por *A. japonicus*

A enzima foi purificada através de coluna cromatográfica de troca iônica, dietilaminoetil celulose (DEAE-Celulose), em uma única etapa.

**Tabela 2.** Purificação da PGase e de *A. japonicus*.

Etapa de purificação	V(mL)	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	AE	P	%
Extrato bruto	100	172	62,6	2,7	1	100
DEAE – Celulose	50	178	7	25,4	9,4	103

AE: atividade específica (U/mg); P: índice de purificação; %: rendimento

Resultados obtidos neste trabalho demonstram que *A. japonicus* teve melhor purificação e rendimento quando comparado com outros fungos filamentosos. A PGase apresentou rendimento de 103 e purificação de 9,4 vezes após aplicação da amostra em uma única coluna de troca iônica (Tabela 2).

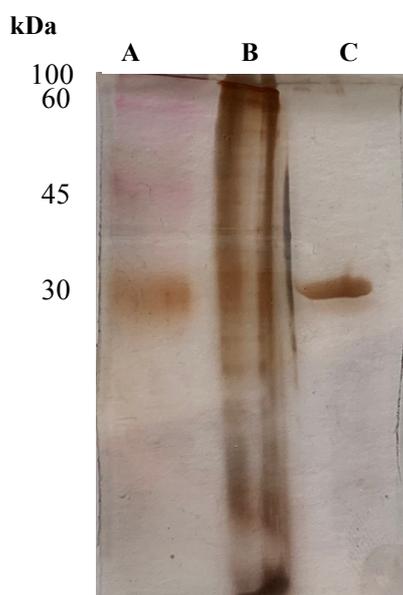
Dados na literatura apresentam diversas maneiras de purificar pectinases. Algumas das metodologias envolvem heterogêneas etapas de cromatografias de troca iônica e filtração em gel. (Pedrolli & Carmona, 2010; Ma et al., 2016). Semenova et al. (2003) isolaram cinco pectinases produzidas por *A. japonicus*, PGI, PGII, PEI, PEII e PL, por cromatografias em coluna de troca iônica e hidrofóbica. A PGase produzida por *A. flavus* foi purificada 8,24 vezes com recuperação de 0,9% da atividade inicial em três etapas: precipitação com acetona, troca iônica CM-Celulose e filtração em gel Sephadex G-100 (Anand et al., 2017). A PGase de *A. niger* foi purificada 2,73 vezes em coluna de filtração Sepharose CL-6B e DEAE-Sepharose (Ma et al., 2017). A PGase de *A.*

*fumigatus* foi purificada 18,43 vezes com recuperação de 2,98% em dois passos: precipitação com acetona e coluna de filtração Sephadex G-100 (Anand et al., 2016).

Tendo como base os resultados da purificação, os experimentos seguintes foram conduzidos utilizando a enzima produzida pelo fungo *A. japonicus*.

### 5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

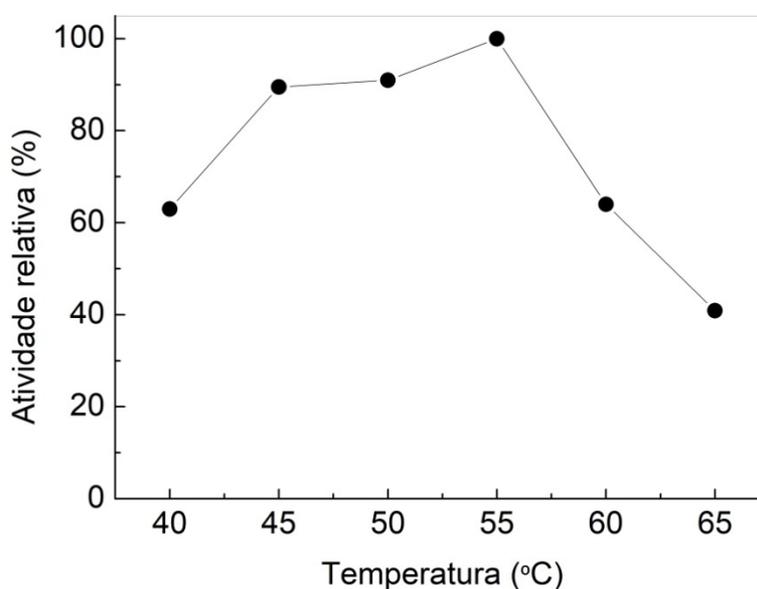
Posteriormente, o perfil proteico da enzima foi determinado por eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%). Observamos uma única banda (Figura 6) com um peso molecular de aproximadamente 34 kDa. Na literatura as massas moleculares de pectinases purificadas variam de 20 a 125 kDa (Jayani et al., 2005; Amin et al., 2017). De acordo com Hamdy (2005), tal variação pode ser atribuída ao fato de que as pectinases são glicoproteínas e, portanto, a variação na glicosilação pode levar a um aumento da massa molecular. A massa molecular notada está entre a faixa de diferentes pectinases isoladas de fungos descritas na literatura; 30 kDa (Ahmed et al., 2016), endo-PGase 38 kDa (Cheng et al., 2016), exo-PGase 66 kDa (Ma et al., 2016).



**Figura 6.** Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%) fixado e corado com kit coloração em prata (Sigma – Aldrich). **A:** peso molecular (ColorBurst, Sigma–Aldrich) **B:** extrato bruto *A. japonicus* (93,9 µg). **C:** PGase purificada (84 µg).

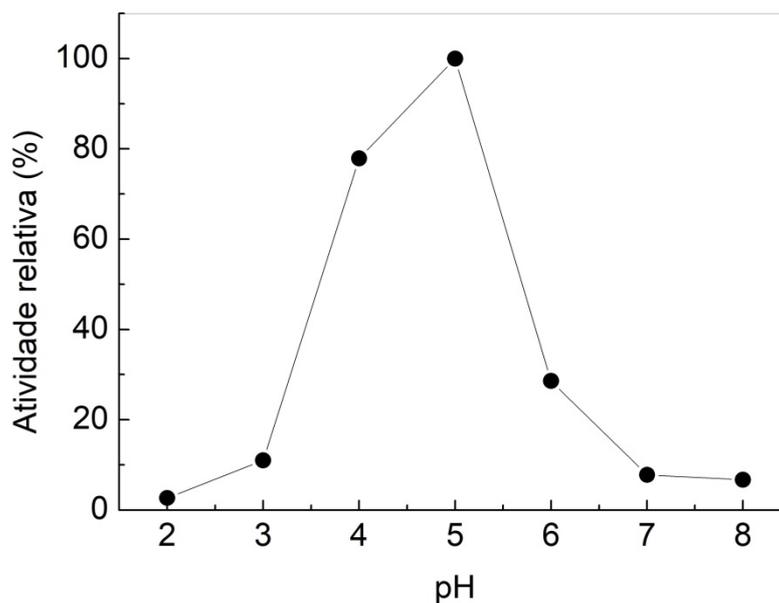
#### 5.4 Caracterização enzimática da PGase purificada de *A. japonicus*

Em relação à temperatura, a enzima purificada apresentou atividade ótima a 55°C, com queda brusca a 65°C (Figura 7). Temperaturas semelhantes foram relatadas para *Aspergillus ficuum* (Yadav et al., 2008), *Fusarium graminearum* (Ortega et al., 2014), *A. awamori* (Dey & Banerjee, 2014), *A. niger* (Anand et al., 2017) e *Penicillium notatum* (Amin et al., 2017). Geralmente, as pectinases isoladas de diferentes fontes fúngicas possuem sua temperatura ótima na faixa de 40-60°C (Jayani et al., 2005; Garg et al., 2016)



**Figura 7.** Influência da temperatura na atividade pectinolítica da enzima purificada de *A. japonicus*. Atividade enzimática foi avaliada em intervalos de temperatura variando de 40 a 65°C, conforme descrito nos itens 4.7.

Quanto ao efeito do pH em relação à atividade pectinolítica da enzima de *A. japonicus*, observamos que o pH ótimo obtido antes e após a purificação foi 5,0 (Figura 8).



**Figura 8.** Influência do pH na atividade pectinolítica da enzima purificada de *A. japonicus*. Atividade enzimática foi avaliada em intervalos de pH variando de 2,0 a 8,0, conforme descrito nos itens 4.7.

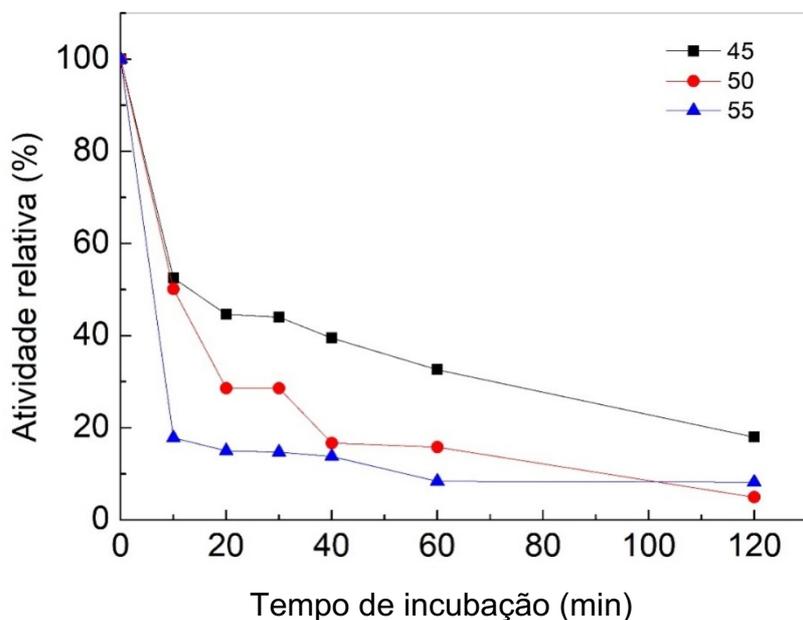
Observa-se em outros estudos envolvendo a caracterização de pectinases ácidas de fungos do gênero *Aspergillus* resultados condizentes com os encontrados neste trabalho, com pH 6,0 em *A. sojae* (Demir & Tari, 2014) e pH 4,5 em *A. niger* (Ibrahim et al., 2014) e *A. heteromorphus* (Mandhania et al., 2010).

O pH ideal das pectinases é uma característica importante para determinar seu uso nas indústrias. Segundo Awasthi (2011) a viscosidade de soluções coloidais da pectina diminui na faixa do pH ácido, então, pectinases ácidas têm sido usadas para extração e clarificação de sucos de frutas (Yadav et al., 2008; Kant et al., 2013; Cheng et al., 2016; Wang et al., 2017; Amin et al., 2017; Ramadan, 2019), enquanto pectinases alcalinas encontram aplicação na fermentação de folhas de café e chá, tratamento de águas residuais e bio-coloração de algodão (Hoondal et al., 2002; Garg et al., 2016; Rebello et al., 2017).

### 5.5 Efeito do pH e temperatura na estabilidade da enzima

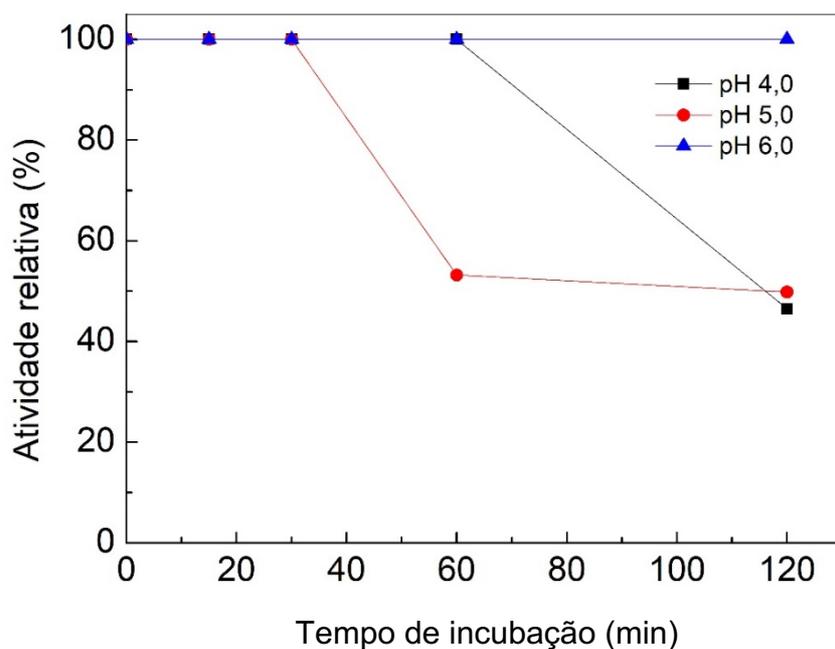
A enzima purificada foi submetida a ensaios de termoestabilidade (Figura 9) nos quais foi dosada a atividade de PGase após o período de incubação a 45, 50 e 55°C. Após 10 minutos de incubação a 45°C a atividade enzimática foi reduzida a 47%, mantendo-se estável durante os 30 minutos, entretanto, após 2h a atividade foi de 25%. A 50°C foi observado meia-vida nos primeiros 10 minutos, decaindo em tempos maiores de incubação. A 55°C, teve queda para 17% em 10 minutos e aos 60 minutos de incubação a atividade pectinolítica foi reduzida a 8% mantendo-se estável por um período de 1h.

Segundo Semenova et al. (2003) a pectinase de *A. japonicus* apresentou meia-vida de 5 minutos a 50°C, já no caso de *A. niger* (Naidu & Panda, 2003), na mesma temperatura, a meia-vida foi de 20 minutos. Dirix et al. (2005) relataram perda de quase 40% da atividade enzimática de *A. aculeatus* após incubação a 50°C em 15 minutos e perda de mais de 95% após incubação a 55°C em 15 minutos.



**Figura 9.** Efeito da termoestabilidade na atividade da PGase de *A. japonicus*. A enzima foi incubada nas temperaturas de 45, 50 e 55 °C e alíquotas foram retiradas nos tempos indicados para a dosagem de atividade enzimática conforme o item 4.3. (■) 45 °C; (●) 50 °C; (▲) 55 °C.

A estabilidade ao pH foi avaliada durante um período de até 2h, na faixa de pHs variando de 4,0 a 6,0. Em pH 6,0 a enzima se manteve totalmente estável durante o período de 2 horas de incubação. A enzima purificada também apresentou uma significativa estabilidade em pH 5,0, mantendo 100% da atividade inicial até os 60 minutos, decaindo 50% em períodos superiores. Já em pH 4,0 a enzima apresentou estabilidade durante os 60 minutos, reduzindo sua meia vida após este período (Figura 10).



**Figura 10.** Efeito da variação do pH na estabilidade da PGase de *A. japonicus*. O teste de estabilidade foi conduzido durante um período de até 2h. Atividade enzimática foi avaliada conforme item 4.3. (■) pH 4,0; (●) pH 5,0; (▲) pH 6,0.

Enzimas pectinolíticas fúngicas normalmente apresentam maior estabilidade em meio ácido. A endo-PGase de *A. awamori* teve o mesmo pH ótimo (pH 5,0) apresentado neste trabalho, não sendo estáveis abaixo de pH 4,0 ou acima de pH 6,0 (Nagai et al., 2000). Já a endo-PGase de *Penillidium* sp. mostrou-se acidofílica e estável, mesmo em uma faixa de pH estreita (4,0 - 5,0) (Yuan et al., 2011).

### 5.6 Efeito de íons e EDTA na atividade da enzima purificada

O efeito de diferentes íons e EDTA sobre a atividade da PGase, sob condições ótimas de pH e temperatura, são mostrados na Tabela 3.

Grande parte dos íons, em concentração de 1 mM, demonstrou pequena influência na atividade da enzima. Nenhum expressou aumento de atividade comparado ao controle. A atividade enzimática foi levemente inibida por  $\text{CaCl}_2$  (30%) e  $\text{FeCl}_3$  (35%). Sassi et al. (2016) relataram que a inibição causada por esses dois íons é resultado da interação dos mesmos com a enzima ou substrato péctico causando a gelificação ou precipitação do substrato. Já  $\text{CuSO}_4$  e  $\text{HgCl}_2$  reduziram atividade enzimática para 31 e 26%, respectivamente.

Aproximadamente 40% das enzimas contém metais como parte da sua estrutura (Guengerich, 2016). A interação desses metais com o sítio ativo das enzimas pode aumentar ou diminuir a atividade catalítica. Na concentração de 5 mM, de  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{HgCl}_2$ , a enzima foi fortemente inibida. Inibição também foi observada na PGase produzida por *Penicillium occitanis* (Sassi et al., 2016; Tounsi et al., 2016).

**Tabela 3.** Efeito de íons e EDTA na atividade da PGase de *A. japonicus*.

	Atividade Relativa (%)	
	1 mM	5 mM
Controle	100 ± 0,18	100 ± 0,18
KCl	72 ± 0,08	45 ± 0,02
EDTA	80 ± 0,02	63 ± 0,02
$\text{CuSO}_4$	31 ± 0	-
$\text{CaCl}_2$	70 ± 0,01	18 ± 0,02
$\text{FeCl}_3$	65 ± 0,1	-
$\text{ZnCl}_2$	68 ± 0,24	4,5 ± 0,01
$\text{MgSO}_4$	89 ± 0,22	52 ± 0,03
$\text{CoCl}_2$	80 ± 0,05	32 ± 0,05
$\text{AlCl}_3$	83 ± 0,03	6,8 ± 0
$\text{HgCl}_2$	26 ± 0,03	-
$\text{NH}_4\text{Cl}$	93 ± 0,05	45 ± 0,04

Controle: sem adição de íons.

Quanto ao EDTA, observou-se uma inibição de 20% na concentração de 1mM e 55% em 5mM. Pedrolli & Carmona (2010) também constataram redução com EDTA na atividade de uma exo-PGase produzida por *A. giganteus* de 22,8 e 78,5% em 2 e 10mM, respectivamente. O EDTA também reduziu em 39% a atividade de uma exo-PGase de *A. niger* na concentração de 1mM (Anand et al., 2017).

### 5.7 Especificidade da PGase purificada ao substrato

Entre os diferentes substratos utilizados para o ensaio enzimático, a pectina de maçã (8,81 U/mL) foi considerada o substrato preferido em relação aos outros dois substratos. As atividades foram de 4,87 e 5,57 U/mL, respectivamente, para pectina cítrica e ácido poligalacturônico (Tabela 4). Os resultados sugerem que a enzima apresenta maior especificidade por pectinas com alto grau de esterificação, no caso, pectina de maçã.

*A. niger* também apresentou preferência (22,42 U/mL) à pectina com grau > 85% de esterificação em relação a pectina (13,30 U/mL) 50-75% de esterificação (He et al., 2018).

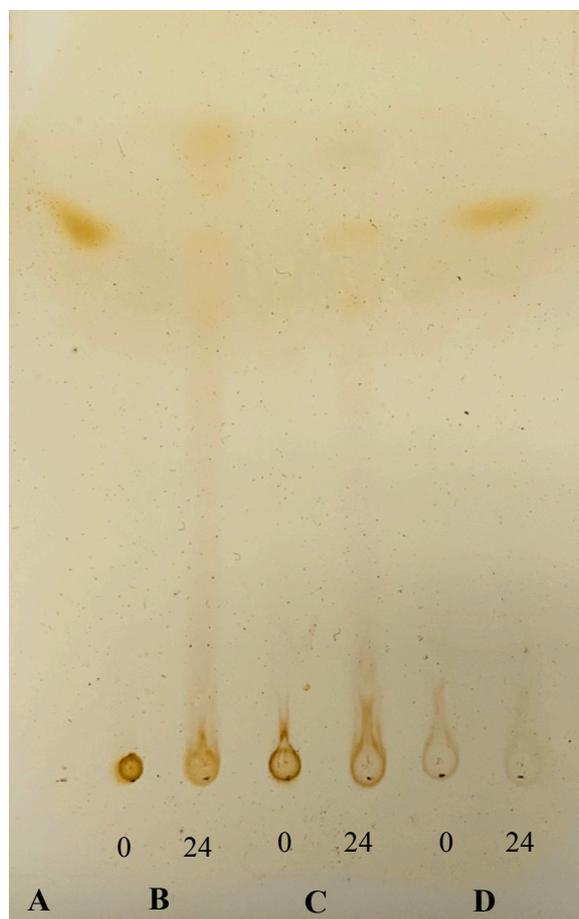
**Tabela 4.** Especificidade do substrato da PGase de *A. japonicus*.

	(U/mL)
Ácido poligalacturônico	4,84 ± 1,08
Pectina cítrica	5,57 ± 2,66
Pectina de maçã	8,81 ± 0,25

### 5.8 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para determinar o modo de ação da PGase purificada, foi realizada a análise dos produtos de hidrólise usando PGase em CCD. Após a incubação da enzima purificada com diferentes pectinas ou ácido poligalacturônico como substrato por 24 horas, observou-se a presença de oligossacarídeos com o mesmo comprimento como produto final (Figura 11), sugerindo que a enzima atue nas extremidades das cadeias do polissacarídeo, tratando-se de uma exo-PGase. A PGase de *A. niger* também liberou

apenas ácido monogalacturônico como produto final quando ácido poligalacturônico foi usado como substrato de reação, demonstrando tratar de uma exo-PGase (Anand et al., 2017).



**Figura 11.** Análise dos produtos de hidrólise usando PGase em CCD. Padrão: ácido galacturônico (A); ácido poligalacturônico (B); pectina cítrica (C) e pectina de maçã (D). Após a incubação nos tempos 0 e 24 horas, 50  $\mu$ L da mistura foram retirados e adicionados a 10  $\mu$ L TCA 100%. As amostras foram fervidas, centrifugadas e aplicadas em CCD. O solvente de corrida e a revelação estão descritos no item 4.11.

### 5.9 Clarificação do suco de frutas pela PGase de *A. japonicus*

Polímeros de carboidratos, como pectina, amido e componentes hemicelulósicos presentes em sucos de frutas, os tornam turvos e viscosos. Esses sucos turvos são menos atraentes para os consumidores e também dificultam a pasteurização e a concentração. A degradação progressiva da lamela média entre as células pode ser feita por enzimas hidrolíticas, enfraquecendo a parede e resultando na liberação de materiais ligados à célula, incluindo água, facilitando a recuperação do suco. Quando os sucos de frutas são tratados com pectinases, são liberadas unidades redutoras de carboidratos, permitindo melhor processamento da polpa e melhorando o rendimento das substâncias contidas na fruta. As PGases ácidas de fungos com estabilidade na faixa de pH ácido são candidatas adequadas especialmente para clarificação de sucos de frutas, uma vez que a maioria desses sucos também são ácidos (Anand et al., 2017; Patidar et al., 2017). Para testar a capacidade de *A. japonicus*, o extrato bruto e a enzima purificada foram aplicados para clarificação de suco de manga tomy, manga keitt, nectarina, mangostim, laranja, mexerica e uva vitória.

O suco tratado com a enzima purificada (2 U/mL) apresentou um aumento de 95,7%, 85,7% e 35,5% na clarificação da manga tomy, manga keitt e laranja, respectivamente (Tabela 5). Em relação ao extrato bruto, ocorreu um aumento de clarificação da polpa de 30,8% de mexerica, 85,8% manga tomy e 73,2% manga keitt. Quanto a nectarina e mangostim, justifica-se o percentual de clarificação baixo devido a clareza que o suco cru já contém. A aplicação de 9,87 U/mL da PGase de *A. awamori* na clarificação do suco de maçã resultou em um aumento na produção de suco de 17,7% em comparação com o suco cru (Dey & Banerjee, 2014).

**Tabela 5.** Clarificação do suco de frutas pela PGase de *A. japonicus*.

Frutas em natura	Clarificação do suco de frutas (%)		pH do suco de fruta
	PGase	Extrato bruto <i>A. japonicus</i>	
Manga Tommy	95.7	85.8	4,0-4,5
Manga Keitt	85.7	73.2	4,5-5,0
Nectarina	5.59	5.59	4,0-4,5
Mangostim	4.10	2.70	3,0-3,5
Laranja	35.5	27.9	5,0-5,5
Mexerica	21.3	30.8	4,0-4,5
Uva Vitória	31.4	24	4,0-4,5

Uma endo-poligalacturonase ácida de *Penicillium oxalicum* aumentou a transmitância de luz da polpa de mamão em 29,5% (Cheng et al. 2016). Também foi relatado uma pectinase de *A. aculeatus* para a clarificação do suco de maçã (97,22%) e umbu (45,52%) (de Oliveira et al., 2018).

Pan et al. (2015) encontraram resultados próximos aos deste estudo, ao utilizar poligalacturonases de *Neosartorya fischeri*, para clarificação dos sucos de morango e maçã, aproximadamente 90% para ambos. O aumento de clarificação no presente trabalho também mostrou-se concordante aos valores encontrados por Piemolini-Barreto, Antônio & Echeverrigaray (2015), os quais estudaram o processo de clarificação no suco de uva e obtiveram 63,20%.

## 6. CONCLUSÃO

Dos 7 fungos testados, *A. japonicus* mostrou a melhor produção de PGase em meio líquido, tendo como fonte de carbono farelo de trigo 1%.

*A. japonicus* apresentou um pico de produção enzimática em apenas 24h, pH ótimo 5,0 e temperatura ótima 45°C.

O processo de purificação foi obtido através de um único passo de cromatografia, alcançando alto rendimento e reduzindo assim o custo e o tempo para obtenção da enzima pura. Foi observado uma única banda com peso molecular de aproximadamente 34 kDa.

O estudo da PGase purificada mostrou características interessantes, tais como atividade ótima em 55°C em meio ácido (pH 5,0), maior preferência pela pectina de maçã quanto ao substrato e juntamente com os resultados de hidrólise, vimos que a pectinase de *A. japonicus* é uma *exo*-PGase.

Foi observado um aumento na clarificação da manga tommy, manga keitt e laranja, respectivamente. Os resultados obtidos no presente estudo fornecem uma boa indicação de que a aplicação da PGase para clarificação é uma proposta promissora para a indústria de suco de frutas.

## REFERÊNCIAS

Abarca, M. L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*, 17(3), S79-84.

Ahmed, I., Zia, M. A., Hussain, M. A., Akram, Z., Naveed, M. T., & Nowrouzi, A. (2016). Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(2), 148-154.

Aikat, K., Maiti, T. K., & Bhattacharyya, B. C. (2001). Decolorization and purification of crude protease from *Rhizopus oryzae* by activated charcoal and its electrophoretic analysis. *Biotechnology letters*, 23(4), 295-301.

Aliaa, A. R. N., Mazlina, M. S., & Taip, F. S. (2010). Impact of commercial pectolytic enzymes on selected properties of white dragon fruit juice. *J Inst Eng Malays*, 71, 25-31.

Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., & Serra, J. L. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 33(1), 21-28.

Amin, F., Bhatti, H. N., Bilal, M., & Asgher, M. (2017). Purification, kinetic, and thermodynamic characteristics of an exo-polygalacturonase from *Penicillium notatum* with industrial perspective. *Applied biochemistry and biotechnology*, 183(1), 426-443.

Anand, G., Yadav, S., & Yadav, D. (2016). Purification and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus fumigatus* MTCC 2584 and elucidating its application in retting of *Crotalaria juncea* fiber. *3 Biotech*, 6(2), 201.

Anand, G., Yadav, S., & Yadav, D. (2017). Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 suitable for clarification of orange juice. *3 Biotech*, 7(2), 122.

Anand, G., Yadav, S., & Yadav, D. (2017). Purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus flavus* MTCC 7589. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, *10*, 264-269.

Aspinall, G. O. (1970). Pectins, plant gums, and other plant polysaccharides. *Pigman, William Ward, Carbohydr Chem Biochem*.

Awasthi, R. (2011). Selection of pectin as pharmaceutical excipient on the basis of rheological behavior. *Int J Pharm Pharm Sci*, *3*(1), 229-31.

BeMiller, J. N. (1986). An introduction to pectins: structure and properties. *Chemistry and function of pectins*, *310*, 2-12.

Benoit, I., Coutinho, P. M., Schols, H. A., Gerlach, J. P., Henrissat, B., & de Vries, R. P. (2012). Degradation of different pectins by fungi: correlations and contrasts between the pectinolytic enzyme sets identified in genomes and the growth on pectins of different origin. *BMC genomics*, *13*(1), 321.

Bergquist, P. L., Te'o, V. J., Gibbs, M. D., Cziferszky, A. C., De Faria, F. P., Azevedo, M. O., & Nevalainen, K. H. (2002). Production of recombinant bleaching enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. *Applied biochemistry and biotechnology*, *98*(1-9), 165-176.

Bonnin, E., Garnier, C., & Ralet, M. C. (2014). Pectin-modifying enzymes and pectin-derived materials: applications and impacts. *Applied microbiology and biotechnology*, *98*(2), 519-532.

Canteri, H. G.; Moreno, L.; Wosiacki, G.; et al.; Pectina: da matéria-prima ao produto final. *Polímeros*, v. 22, p. 149-157, 2012.

Cheng, Z., Chen, D., Lu, B., Wei, Y., Xian, L., Li, Y., & Huang, R. (2016). A novel acid-stable endo-polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028: purification,

characterization, and application in the beverage industry. *J Microbiol Biotechnol*, 26(6), 989-998.

Cherry, J. R., & Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current opinion in biotechnology*, 14(4), 438-443.

Croak, S., & Corredig, M. (2006). The role of pectin in orange juice stabilization: Effect of pectin methylesterase and pectinase activity on the size of cloud particles. *Food Hydrocolloids*, 20(7), 961-965.

de Carvalho Silva, J., de França, P. R. L., de Melo, A. H. F., Neves-Petersen, M. T., Converti, A., & Porto, T. S. (2019). Optimized production of *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonases for pectin hydrolysis in hog plum (*Spondias mombin* L.) juice. *Process Biochemistry*, 79, 18-27.

de Lima Damásio, A. R., Da Silva, T. M., Maller, A., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., & de Moraes, M. D. L. T. (2010). Purification and partial characterization of an exo-polygalacturonase from *Paecilomyces variotii* liquid cultures. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(5), 1496-1507.

de Oliveira, R. L., Dias, J. L., da Silva, O. S., & Porto, T. S. (2018). Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor. *Food and bioproducts processing*, 109, 9-18.

Demir, H., & Tarı, C. (2014). Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. *Industrial Crops and Products*, 54, 302-309.

Dey, T. B., & Banerjee, R. (2014). Application of decolourized and partially purified polygalacturonase and  $\alpha$ -amylase in apple juice clarification. *Brazilian journal of microbiology*, 45(1), 97-104.

Dirix, C., Duvetter, T., Van Loey, A., Hendrickx, M., & Heremans, K. (2005). The in situ observation of the temperature and pressure stability of recombinant *Aspergillus*

*aculeatus* pectin methylesterase with Fourier transform IR spectroscopy reveals an unusual pressure stability of  $\beta$ -helices. *Biochemical Journal*, 392(3), 565-571.

Favela-Torres, E., Volke-Sepúlveda, T., & Viniegra-González, G. (2006). Production of Hydrolytic Depolymerising Pectinases. *Food Technology & Biotechnology*, 44(2).

Gainvors, A., Frezier, V., Lemaesquier, H., Lequart, C., Aigle, M., & Belarbi, A. (1994). Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast*, 10(10), 1311-1319.

Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., Kaur, J., & Mahajan, R. (2016). Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. *3 Biotech*, 6(1), 47.

Grohmann, K., & Baldwin, E. A. (1992). Hydrolysis of orange peel with pectinase and cellulase enzymes. *Biotechnology Letters*, 14(12), 1169-1174.

Guengerich, F. P. (2016). Metals in Biology 2016: Molecular basis of selection of metals by enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 291(40), 20838-20839.

Gummadi, S. N., & Panda, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. *Process biochemistry*, 38(7), 987-996.

Hamdy, H. S. (2005). Purification and characterization of pectin lyase produced by *Rhizopus oryzae* grown on orange peels. *Annals of Microbiology*, 55(3), 205.

He, Y., Pan, L., & Wang, B. (2018). Efficient over-expression and application of high-performance pectin lyase by screening *Aspergillus niger* pectin lyase gene family. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 23(6), 662-669

Hoondal, G., Tiwari, R., Tewari, R., Dahiya, N. B. Q. K., & Beg, Q. (2002). Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(4-5), 409-418.

Hu, H. L., Van den Brink, J., Gruben, B. S., Wösten, H. A. B., Gu, J. D., & De Vries, R. P. (2011). Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 248-252.

Hwang, J., & Kokini, J. L. (1992). Contribution of the side branches to rheological properties of pectins. *Carbohydrate polymers*, 19(1), 41-50.

Ibrahim, D., Weloosamy, H., & Sheh-Hong, L. (2014). Potential use of nylon scouring pad cubes attachment method for pectinase production by *Aspergillus niger* HFD5A-1. *Process Biochemistry*, 49(4), 660-667.

Iwashita K. (1989) Review: recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *J Biosci Bioeng*. 94(6):530–5.

Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931-2944.

Kant, S., Vohra, A., & Gupta, R. (2013). Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein expression and purification*, 87(1), 11-16.

Karaki, N., Aljawish, A., Humeau, C., Muniglia, L., & Jasniewski, J. (2016). Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, properties, and potential applications: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 90, 1-18.

Karam, N. E., & Belarbi, A. (1995). Detection of polygalacturonases and pectin esterases in lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(5), 559-563.

Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource technology*, 77(3), 215-227.

Kumar, S., Sharma, H., Sarkar, B. (2011). Effect of substrate and fermentation conditions on pectinase and cellulase production by *Aspergillus Niger* NCIM 548 in submerged (SmF) and solidstate fermentation (SSF). *Food Sci. Biotechnol.* 20 (5), 1289–1298.

Kumar, P. G., & Suneetha, V. (2014). A cocktail enzyme-pectinase from fruit industrial dump sites: a review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(2), 1252-1258.

Kumar, S., Jain, N.K., Sharma, K.C., Mishra, B.K., Srinivasan, R., Paswan, R. (2015). Optimization, purification and characterization of pectinases from pectinolytic strain, *Aspergillus foetidus* MTCC 10559. *J. Environ.Biol.* 36 (2), 483–489.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680.

Lanzarini, G., & Pifferi, P. G. (1989). Enzymes in the fruit juice industry. In *Biotechnology applications in beverage production* (pp. 189-222), Springer, Dordrecht.

Larios, G., Garcia, J. M., & Huitron, C. (1989). Endo-polygalacturonase production from untreated lemon peel by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043. *Biotechnology letters*, 11(10), 729-734.

Li, P.J., Xia, J.L., Shan, Y., Nie, Z., Su, D., Gao, Q., Zhang, C., Ma, Y.(2015). Optimizing production of pectinase from orange peel by *Penicillium oxalicum* PJ02 using response surface methodology. *Waste Biomass Valori* 6 (1), 13–22.

Lingxia, S., & Steven, N. (2010). Analysis of promoter activity of members of the Pectate Lyase-Like (PLL) gene family in cell separation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 10(1), 152.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.

Ma, Y., Sun, S., Hao, H., & Xu, C. (2016). Production, purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Penicillium janthinellum* sw09. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88, 479-487.

Mayans, O., Scott, M., Connerton, I., Gravesen, T., Benen, J., Visser, J., ... & Jenkins, J. (1997). Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases. *Structure*, 5(5), 677-689.

Mandhania, S., Jain, V., & Malhotra, S. P. (2010). Culture optimization for enhanced production of microbial pectin methyltransferase under submerged conditions. *Asian J Biochem*, 5(1), 12-22.

Markham, K. R., Gould, K. S., Winefield, C. S., Mitchell, K. A., Bloor, S. J., & Boase, M. R. (2000). Anthocyanic vacuolar inclusions—their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry*, 55(4), 327-336.

Martin, N., Souza, S. R. D., Silva, R. D., & Gomes, E. (2004). Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(5), 813-819.

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.

Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 266-277.

Murad, H. A., & Azzaz, H. H. (2011). Microbial pectinases and ruminant nutrition. *Research Journal of Microbiology*, 6(3), 246-269.

Mussatto, S. I., & Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate polymers*, 68(3), 587-597.

Mutlu, M., Sarioğlu, K., Demir, N., Ercan, M. T., & Acar, J. (1999). The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. *Journal of Food Engineering*, 41(3-4), 147-150.

Nagai, M., Katsuragi, T., Terashita, T., Yoshikawa, K., & Sakai, T. (2000). Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(8), 1729-1732.

Naidu, G. S. N., & Panda, T. (2003). Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 16(1), 57-67.

Ortega, L. M., Kikot, G. E., Rojas, N. L., López, L. M., Astoreca, A. L., & Alconada, T. M. (2014). Production, characterization, and identification using proteomic tools of a polygalacturonase from *Fusarium graminearum*. *Journal of basic microbiology*, 54(S1), S170-S177.

Ortiz, G. E., Ponce-Mora, M. C., Nosedá, D. G., Cazabat, G., Saravalli, C., López, M. C., & Albertó, E. O. (2017). Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 44(2), 197-211.

Padma, P. N., Anuradha, K., & Reddy, G. (2011). Pectinolytic yeast isolates for cold-active polygalacturonase production. *Innovative food science & emerging technologies*, 12(2), 178-181.

Pan, X., Li, K., Ma, R., Shi, P., Huang, H., Yang, P., & Yao, B. (2015). Biochemical characterization of three distinct polygalacturonases from *Neosartorya fischeri* P1. *Food chemistry*, 188, 569-575.

Patidar, M., Nighojkar, A., Nighojkar, S., & Kumar, A. (2016). Purification and characterization of pectin methylesterase produced in solid state fermentation by *Aspergillus tubingensis*. *British Biotechnology J.* 12, 1, 10.

Patidar, M. K., Nighojkar, A., Nighojkar, S., & Kumar, A. (2017). Purification and characterization of polygalacturonase produced by *Aspergillus niger* AN07 in Solid State Fermentation. *Canadian Journal of Biotechnology*, 1(1), 11.

Pedrolli, D.B., Gomes, E., Monti, R., & Carmona E.C. (2008). Studies on productivity and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus giganteus* submerged culture using citrus pectin and orange waste. *Applied biochemistry and biotechnology*, 144 (2), 191–200.

Pedrolli, D. B., & Carmona, E. C. (2010). Purification and characterization of the exopolygalacturonase produced by *Aspergillus giganteus* in submerged cultures. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(6), 567-573.

Phutela, U., Dhuna, V., Sandhu, S., Sandhu, S., Chadha, B.S., 2005. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Brazilian Journal of Microbiology*. 36 (1), 63–69.

Pifferi, P. G., Tramontini, M., & Malacarne, A. (1989). Immobilization of endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* on various types of macromolecular supports. *Biotechnology and bioengineering*, 33(10), 1258-1266.

Piemolini-Barreto, L. T., Antônio, R. V., & Echeverrigaray, S. (2015). Comparison of a pectinolytic extract of *Kluyveromyces marxianus* and a commercial enzyme preparation in the production of Ives (*Vitis labrusca*) grape juice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(5), 755-762.

Ramadan, M. F. (2019). Enzymes in fruit juice processing. In *Enzymes in food biotechnology* (pp. 45-59). Academic Press.

Rangarajan, V., Rajasekharan, M., Ravichandran, R., Sriganesh, K., & Vaitheeswaran, V. (2010). Pectinase production from orange peel extract and dried orange peel solid as substrates using *Aspergillus niger*. *Int J Biotechnol Biochem*, 6(3), 445-453.

- Rebello, S., Anju, M., Aneesh, E. M., Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2017). Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: An overview. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 16(3), 381-394.
- Revilla, I., & González-San José, M. L. (2003). Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *International journal of food science & technology*, 38(1), 29-36.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57(6), 929-967.
- Rizzatti, A. C. S., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Rechia, C. G. V., & Polizeli, M. L. T. M. (2001). Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 156-160.
- Rombouts, F. M., & Pilnik, W. (1980). Pectic enzymes. In *Economic Microbiology, Vol. 5: Microbial Enzymes and Bioconversions* (pp. 227-282). Academic Press.
- Rosmine, E., Sainjan, N. C., Silvester, R., Alikkunju, A., & Varghese, S. A. (2017). Statistical optimisation of xylanase production by estuarine *Streptomyces* sp. and its application in clarification of fruit juice. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 393-401.
- Ruiz, H. A., Rodríguez-Jasso, R. M., Rodríguez, R., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2012). Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. *Biochemical engineering journal*, 65, 90-95.
- Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., & Vandamme, E. J. (1993). [ Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production,] Properties, and Applications. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 39, pp. 213-294). Academic Press.
- Sassi, A. H., Tounsi, H., Trigui-Lahiani, H., Bouzouita, R., Romdhane, Z. B., & Gargouri, A. (2016). A low-temperature polygalacturonase from *P. occitanis*:

characterization and application in juice clarification. *International journal of biological macromolecules*, 91, 158-164.

Semenova, M. V., Grishutin, S. G., Gusakov, A. V., Okunev, O. N., & Sinitsyn, A. P. (2003). Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry (Moscow)*, 68(5), 559-569.

Shanmugavel, M., Vasantharaj, S., Yazhmozhi, A., Bhavsar, P., Aswin, P., Felshia, C., & Gnanamani, A. (2018). A study on pectinases from *Aspergillus tamarii*: Toward greener approach for cotton bioscouring and phytopigments processing. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 15, 295-303.

Sharma, A., & Gupta, M. N. (2001). Purification of pectinases by three-phase partitioning. *Biotechnology Letters*, 23(19), 1625-1627.

Sharma, N., Rathore, M., & Sharma, M. (2013). Microbial pectinase: sources, characterization and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(1), 45-60.

Shen, Z., Manning, G., Reese, J. C., & Reeck, G. R. (1999). Pectin methylesterase from the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.)(Coleoptera: Curculionidae): Purification and characterization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(3), 209-214.

Shet, A. R., Desai, S. V., & Achappa, S. (2018). Pectinolytic enzymes: classification, production, purification and applications. *Res J Life Sci Bioinform Pharm Chem Sci*, 4, 337-348.

Siddiqui, M., Pande, V., & Arif, M. (2012). Production, purification, and characterization of polygalacturonase from *Rhizomucor pusillus* isolated from decomposing orange peels. *Enzyme research*, 2012.

Soares, M. M. C. N., Da Silva, R., Carmona, E. C., & Gomes, E. (2001). Pectinolytic enzyme production by *Bacillus* species and their potential application on juice extraction. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 79-82.

Solis-Pereira, S., Favela-Torres, E., Viniestra-González, G., & Gutiérrez-Rojas, M. (1993). Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 36-41.

Srirangarajan, A. N., & Shrikhande, A. J. (1979). Comparative aspects of pectin extracted from the peels of different varieties of mango. *International Journal of Food Science & Technology*, 14(5), 539-541.

Taragano, V., Sanchez, V. E., & Pilosof, A. M. R. (1997). Combined effect of water activity depression and glucose addition on pectinases and protease production by *Aspergillus niger*. *Biotechnology letters*, 19(3), 233-236.

Tari, C., Göğüs, N., & Tokatli, F. (2007). Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. *Enzyme and microbial technology*, 40(5), 1108-1116.

Teixeira, J. A., Gonçalves, D. B., De Queiroz, M. V., & De Araujo, E. F. (2011). Improved pectinase production in *Penicillium griseoroseum* recombinant strains. *Journal of applied microbiology*, 111(4), 818-825.

Tochi, B. N., Wang, Z., Xu, S. Y., & Zhang, W. (2009). The Influence of a pectinase and pectinase/hemicellulases enzyme preparations on percentage pineapple juice recovery, particulates and sensory attributes. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(8), 1184-1189.

Torres, S., Sayago, J. E., Ordoñez, R. M., & Isla, M. I. (2011). A colorimetric method to quantify endo-polygalacturonase activity. *Enzyme and microbial technology*, 48(2), 123-128.

Tounsi, H., Sassi, A. H., Romdhane, Z. B., Lajnef, M., Dupuy, J. W., Lapailierie, D., ... & Hadj-Taieb, N. (2016). Catalytic properties of a highly thermoactive

polygalacturonase from the mesophilic fungus *Penicillium occitanis* and use in juice clarification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 127, 56-66.

Trindade, L. V., Desagiacomo, C., Polizeli, M. D. L. T. D., Damasio, A. R. D. L., Lima, A. M. F., Gomes, E., & Bonilla-Rodriguez, G. O. (2016). Biochemical characterization, thermal stability, and partial sequence of a novel exo-polygalacturonase from the thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus* A13. 36 obtained by submerged cultivation. *BioMed research international*, 2016.

Versari, A., Biesenbruch, S., Barbanti, D., Farnell, P. J., & Galassi, S. (1997). Effects of pectolytic enzymes on selected phenolic compounds in strawberry and raspberry juices. *Food Research International*, 30(10), 811-817.

Wang, J.J., Zhang, Y.H., Qin, X., Gao, L., Han, B., Zhang, D., Li, J., Huang, H., Zhang W., (2017). Efficient expression of an acidic endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* and its application in juice production. *J. Agr. Food Chem.* 65 (13), 2730–2736.

Warnock, D. W., Arthington-Skaggs, B. A., & Li, R. K. (1999). Antifungal drug susceptibility testing and resistance in *Aspergillus*. *Drug Resistance Updates*, 2(5), 326-334.

Whitaker, J. R. (1990). Microbial pectinolytic enzymes. In: Fogarty, W.M.; Kelly, C.T.; editors. *Microbial enzymes and biotechnology*, 2 ed., London: Elsevier Science Ltd., p. 133–76.

Whitaker, J. R., & Stauffer, C. E. (1994). Principles of Enzymology for the Food Sciences (2nd edn). *Trends in Food Science and Technology*, 5(9), 304-304.

Wikiera, A., Mika, M., & Grabacka, M. (2015). Multicatalytic enzyme preparations as effective alternative to acid in pectin extraction. *Food Hydrocolloids*, 44, 156-161.

Willats, W. G., Knox, J. P., & Mikkelsen, J. D. (2006). Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends in Food Science & Technology*, 17(3), 97-104.

Yadav, S., Yadav, P. K., Yadav, D., & Yadav, K. D. S. (2008). Purification and characterisation of an acidic pectin lyase produced by *Aspergillus ficuum* strain MTCC 7591 suitable for clarification of fruit juices. *Annals of microbiology*, 58(1), 61-65.

Yuan, P., Meng, K., Huang, H., Shi, P., Luo, H., Yang, P., & Yao, B. (2011). A novel acidic and low-temperature-active endo-polygalacturonase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669 with potential for application in apple juice clarification. *Food Chemistry*, 129(4), 1369-1375.

Zeni, J., Cence, K., Grando, C. E., Tiggermann, L., Colet, R., Lerin, L. A., & Valduga, E. (2011). Screening of pectinase-producing microorganisms with polygalacturonase activity. *Applied biochemistry and biotechnology*, 163(3), 383-392.

Zheng, Z., & Shetty, K. (2000). Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process biochemistry*, 35(8), 825-830.

## ANEXO



Ministério do Meio Ambiente  
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AA6884A

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AA6884A**  
Usuário: **UFMS**  
CPF/CNPJ: **15.461.510/0001-33**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

**Espécie**

Impossibilidade de identificação

**Aspergillus japonicus**

**Trichoderma koningii**

**Aspergillus fumigatus**

**Aspergillus niger**

**Penicillium funiculosum**

**Penicillium solitum**

**Trichoderma virens**

Impossibilidade de identificação

Impossibilidade de identificação

Impossibilidade de identificação

Impossibilidade de identificação

**Cladosporium cladosporioides**

**Acremonium strictum**  
**Aspergillus niveus**  
**Aspergillus terreus**  
**Aspergillus terreus**  
**Aspergillus flavus**  
**Aspergillus flavus**  
**Aspergillus oryzae**  
**Impossibilidade de identificação**

Título da Atividade:

**Estudo bioquímico das enzimas produzidas por fungos filamentosos**

**Equipe**

Giovana Cristina Giannesl	UFMS
Alex do Nascimento Franco	ufms
Aline Pereira de Almeida	UFMS
Amanda Borges Colman	UFMS
Amanda Marques Kai	UFMS/FAMEZ
André Tolentino Pinheiro de Oliveira	UFMS
Angela Akimi Shimabukuro	UFMS/INQUI
Arthur dos Santos Montanholi	UFMS
Bruna Mesquita Barroso Furtado de Mendonça	UFMS
Camila Aparecida Marques De Moraes	UFMS/INBIO
Carla de Oliveira Santos	UFMS/INBIO
Caroline Ramires da Silva	UFMS
Charles Kiefer	UFMS/FAMEZ
Clarice Rossato Marchetti	UFMS/INBIO
Daniel Guerra Franco	UFMS/INBIO
Denis Pires de Lima	UFMS/INQUI
Douglas Chodí Masul	UFMS/INBIO
Edivaldo Ximenes Ferreira Filho	UNB
Edson dos Anjos dos Santos	UFMS/INBIO
Émille Souza Rodrigues	UFMS
Emmly Ernesto de Lima	UFMS

Evelyn de Andrade Salomão	UFMS
Fabiana Fonseca Zanoelo	UFMS/INBIO
Isabela Pavão Vargas	UFMS/ INBIO
Jeandre Augusto dos Santos Jaques	UFMS/ INBIO
Jéssica Dias	UFMS
João Atílio Jorge	USP/FFCLRP
John Dayvan Maidana Serpa	UFMS/INBIO
Jorge H.A. Betini	USP/FFCLRP
Larissa Costa Olarte	UFMS
Leticia Manvaller	UFMS
Malson Neilson de Lucena	UFMS/INBIO
Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli	USP/FFCLRP
Maria Rita Marques	UFMS/INBIO
Michele Sorgatto	UFMS
Neleiele Cavalleri de Alencar Guimarães	UFMS
Patrícia Oliveira da Silva	UFMS
Rafael Pontes	UFMS
Regiane Nogueira Spalanzani	UFMS
Simone Carvalho Peixoto-Nogueira	USP/FFCLRP
Thais Gonçalves de Matos	UFMS
Yvelise Maria Possiede	UFMS/INBIO

#### Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **Publicação em Congressos Científicos e revistas**

Data do Cadastro: **03/09/2018 09:18:16**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 13:35 de 11/02/2020.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**