



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA  
EXO-POLIGALACTURONASE DE *Penicillium janthinellum* VI2R3M**

**JULIANA PAGNONCELI**

**CASCAVEL – PR  
2018**

**JULIANA PAGNONCELI**

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA  
EXO-POLIGALACTURONASE DE *Penicillium janthinellum* VI2R3M**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre na Área de Concentração em Ciências Farmacêuticas, na Linha de Pesquisa “Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde”.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller

**CASCADEL - PR  
2018**

Pagnonceli, Juliana

Purificação, caracterização e aplicação de uma exopoligalacturonase de *Penicillium janthinellum* VI2R3M / Juliana Pagnonceli; orientador(a), Alexandre Maller, 2018.

42 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.

1. *Penicillium janthinellum*. 2. Poligalacturonase. 3. Purificação. 4. Clarificação. I. Maller, Alexandre . II. Título.

**JULIANA PAGNONCELI**

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA  
EXO-POLIGALACTURONASE DE *Penicillium janthinellum* VI2R3M**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre na Área de Concentração em Ciências Farmacêuticas, na Linha de Pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller

**BANCA EXAMINADORA:**



Prof. Dr. Alexandre Maller  
*Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná - UNIOESTE*



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Claudia Paiva Alegre Maller  
*Faculdade Assis Gurgacz - FAG*



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina Kimiko Kadowaki  
*Universidade Estadual do Oeste do  
Paraná - UNIOESTE*

**Cascavel - PR  
2018**

## **BIOGRAFIA RESUMIDA**

Juliana Pagnonceli, natural de Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil, nascida no dia 01 de Setembro de 1982, tem graduação em Farmácia pela Universidade Paranaense, UNIPAR (2008), habilitação em Análises Clínicas pela UNIPAR (2009), especialização em Análises Clínicas pela Faculdade Cathedral (2015). Possuiu vínculo empregatício em Laboratório de Análises Clínicas nos anos de 2000 a 2012, e em Farmácia de Manipulação entre 2012 a 2016. Atualmente é Mestranda da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), no Programa de Pós-graduação stricto sensu em Ciências Farmacêuticas. Desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientada pelo Prof. Dr. Alexandre Maller.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Ao meu pai, mãe e irmão pelo amor incondicional, incentivo, paciência e total ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo.

Ao meu noivo Victor pelo companheirismo, amor, apoio e carinho demonstrado em todos os momentos e, principalmente, por sua imensa e incansável ajuda na realização deste trabalho.

Ao meu professor orientador Dr. Alexandre Maller, pelas sugestões, críticas, apoio e incentivo, mas principalmente, pelos seus ensinamentos e exemplo de um grande mestre.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marina Kimiko Kadowaki pelo imprescindível apoio na realização de análises laboratoriais e também pela atenção, sugestões e amizade.

Ao Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva por todo auxílio prestado e conhecimentos compartilhados.

A todos do Laboratório de Bioquímica, em especial Carla Lieko Della Torre, Débora Jacomini, Larissa Bussler, Indianara Bueno, Letícia Rasbold, Giovane Bruno Rocha, Ana Cláudia M. Corsato, Charles Seuchuco, Paulo Ricardo Heinen e Juliana M. Corrêa pela troca de experiências, apoio e companheirismo durante esta trajetória.

A minha querida amiga Jalusa, que me incentivou e esteve sempre presente ao meu lado durante esta etapa acadêmica.

Agradeço à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, por permitir a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Meus agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

# PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA EXO-POLIGALACTURONASE DE *Penicillium janthinellum* VI2R3M

## RESUMO

Pectinases são enzimas em crescente uso no setor industrial como na indústria de sucos, vinhos, alimentos, papel e tecidos. Podem ser produzidas por uma variedade de microrganismos, mas os fungos apresentam maiores vantagens pois se adaptam a grande variedade de substratos, possuem um rápido crescimento e apresentam ampla prevalência no meio ambiente. As pectinases atuam sobre a pectina, que é um dos principais componentes da parede celular de plantas e é rica em ácido galacturônico (GalA). Entre as pectinases, a poligalacturonase (PG) degrada a molécula de pectina atuando internamente e ao acaso na cadeia, liberando oligossacarídeos (endo-PG), ou por ataque da extremidade não redutora da cadeia, liberando monossacarídeos (exo-PG). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar a produção de uma poligalacturonase a partir do fungo *Penicillium janthinellum* VI2R3M, que foi isolado da Mata Atlântica do Oeste do Paraná, e após, purificar, caracterizar e testar uma possível aplicabilidade. A enzima foi produzida através de cultivo em meio Khanna, em seguida foi purificada através de colunas cromatográficas e sua pureza e massa molecular confirmada por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Posteriormente, a enzima foi caracterizada bioquimicamente quanto ao pH, temperatura, influência dos íons metálicos, especificidade ao substrato, produtos de hidrólise, peso molecular, parâmetros cinéticos ( $K_m$ ,  $V_{máx}$ ,  $K_{cat}$ ) e verificada a aplicação na clarificação de sucos. Uma PG foi purificada após duas etapas cromatográficas envolvendo colunas de troca iônica (DEAE-Sephadex) e filtração molecular (Sephadex G100). A pureza e massa molecular (102,0 kDa) da enzima foram determinadas por SDS-PAGE. A enzima apresentou atividade máxima em pH 5,0 e na temperatura de 50 °C, mantendo-se 100% estável a 50 °C por 30 minutos e 80% em pH 3,0 a 5,0 por 24 horas. O íon metálico  $Mg^{2+}$  aumentou a atividade da enzima significativamente. Parâmetros cinéticos, ou seja, o  $K_m$ ,  $V_{max}$  e  $K_{cat}$  para hidrólise da pectina foram de 2,56 mg/mL, 163,1 U/mg e  $277s^{-1}$  respectivamente. A PG é altamente específica para o substrato ácido poligalacturônico e gerou ácido mono-galacturônico, produtos característicos da ação de exo-PG. Os sucos clarificados de laranja, maçã e manga apresentaram aumento da transmitância em 35, 45, 49%, respectivamente, com redução da cor em 22, 51, 55%, respectivamente. Dessa forma, a exo-PG de *P. janthinellum* VI2R3M possui características bioquímicas interessantes para aplicação em indústrias de sucos.

## PALAVRAS CHAVE

Pectinase, poligalacturonase, purificação, *Penicillium janthinellum*, clarificação.

# PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF EXO-POLYGALACTURONASE FROM *Penicillium janthinellum* VI2R3M

## ABSTRACT

Pectinases are enzymes in increasing use in the industrial sector as in the juice, wine, food, paper and fabric industries. They can be produced by a variety of microorganisms, but the fungi have greater advantages because they adapt to the great variety of substrates, they have a fast growth and they present wide prevalence in the environment. Pectinases act on pectin, which is one of the major components of the cell wall of plants and is rich in galacturonic acid (GalA). Among pectinases, polygalacturonase (PG) degrades the pectin molecule by acting internally and randomly in the chain, releasing oligosaccharides (endo-PG), or by attacking the non-reducing end of the chain, releasing monosaccharides (exo-PG). In view of the above, the objective of this work was to investigate the production of a polygalacturonase from the fungus *Penicillium janthinellum* VI2R3M, which was isolated from the Atlantic Forest of the West of Paraná, and afterwards, to purify, characterize and test a possible applicability. The enzyme was produced by culturing in Khanna medium, then purified through chromatographic columns and its purity and molecular weight confirmed by electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE). Subsequently, the enzyme was biochemically characterized in terms of pH, temperature, influence of metal ions, substrate specificity, hydrolysis products, molecular weight, kinetic parameters ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $K_{cat}$ ) and application of juice clarification. A PG was purified after two chromatographic steps involving ion exchange columns (DEAE-Sephadex) and molecular filtration (Sephadex G100). The purity and molecular mass (102.0 kDa) of the enzyme were determined by SDS-PAGE. The enzyme showed maximum activity at pH 5.0 and temperature at 50 °C, remaining 100% stable at 50 °C for 30 minutes and 80% at pH 3.0 to 5.0 for 24 hours. The  $Mg^{2+}$  metal ion increased enzyme activity significantly. Kinetic parameters, that is,  $K_m$ ,  $V_{max}$  e  $K_{cat}$  for pectin hydrolysis were 2.56 mg/mL, 163.1 U/mg and 277s<sup>-1</sup>, respectively. PG is highly specific for the polygalacturonic acid substrate and generated mono-galacturonic acid, products characteristic of exo-PG action. The clarified juices of orange, apple and mango presented an increase in transmittance at 35, 45, 49%, respectively, with reduction of color in 22, 51, 55%, respectively. In this way, the exo-PG of *P. janthinellum* VI2R3M has interesting biochemical characteristics for application in juice industries.

## KEYWORDS

Pectinase, polygalacturonase, purification, *Penicillium janthinellum*, clarification.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>PALAVRAS CHAVE</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>KEYWORDS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABELAS DO ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	ix
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	12
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivos Específicos.....	12
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
3.1 Pectina.....	13
3.2 Pectinases .....	16
3.3 Poligalacturonase .....	18
3.4 Fontes microbianas de pectinases.....	19
<b>4. CAPÍTULO I:</b> .....	21
Purificação, caracterização e aplicação de uma exo-poligalacturonase de <i>Penicillium janthinellum</i> VI2R3M. (Artigo submetido à revista Applied Biochemistry and Biotechnology, QUALIS/CAPES B2)	
RESUMO .....	21
PALAVRAS-CHAVE .....	21
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS .....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27

CONCLUSÃO .....	33
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>35</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>35</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>37</b>
7.1 Referências da revisão de literatura .....	37
7.2 Referências do artigo científico.....	40

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

Tabela 1	Tabela de purificação da PG de <i>Penicillium janthinellum</i> VI2R3M.....	28
Tabela 2	Especificidade ao substrato da PG de <i>Penicillium janthinellum</i> VI2R3M.....	30
Tabela 3	Efeito de íons metálicos na atividade da PG de <i>Penicillium janthinellum</i> VI2R3M.....	31
Tabela 4	Efeito da PG na clarificação de sucos de laranja, maçã e manga.....	33

## LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1	Arranjo de fibras de pectina, juntamente com as fibras de celulose e hemicelulose em uma parede celular de planta	13
Figura 2	Estrutura básica da pectina .....	14
Figura 3	Modo de ação de Endo e Exo-poligalacturonase e seus derivados .....	19

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1	Produção de poligalacturonase em meio Khanna suplementado com fontes de carbono variadas .....	27
Figura 2	Análise por SDS-PAGE e zimograma da PG purificada .....	28
Figura 3	Efeito da temperatura e pH na atividade e estabilidade da PG .....	30
Figura 4	Cromatografia em camada delgada (CCD) da PG purificada de <i>Penicillium janthinellum</i> VI2R3M. ....	32
Figura 5	Clarificação de sucos. ....	33

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

GaIA	Ácido galacturônico
HG	Homogalacturonana
PE	Pectinesterase
PG(s)	Poligalacturonase(s)
PGA	Ácido poligalacturônico
PGL	Poligalacturonato liase
PMG	Polimetilgalacturonase
PMGL	Polimetilgalacturonato liase
RGI	Ramnogalacturonana I
RGII	Ramnogalacturonana II

## 1. INTRODUÇÃO

Técnicas biotecnológicas estão sendo utilizadas para a produção e comércio de enzima, as quais têm sido usadas em grande escala na indústria farmacêutica, alimentar, de papel, têxtil, entre outras. Com isto, é crescente o interesse pela bioprospecção de microrganismos capazes de produzir grande quantidade de enzima e que apresentam facilidade de acesso, manipulação e cultivo.

Os fungos são microrganismos que apresentam diversas vantagens na produção enzimática, como as pectinases, pois se adaptam a grande variedade de substratos, possuem rápido crescimento e apresentam ampla prevalência no meio ambiente.

Enzimas pécticas (pectinases) são capazes de degradar a pectina, que é um polissacarídeo presente na parede celular de plantas, sendo constituído principalmente de polímeros de ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose e a sua principal característica é conferir consistência e rigidez ao fruto e à planta. Assim, as pectinases apresentam benefícios industriais na extração e clarificação de sucos, maceração de vegetais e frutas, na extração de óleos e na indústria de papel e celulose.

As poligalacturonases (PG) catalisam a hidrólise de ligação  $\alpha$ -1,4 entre resíduos de ácido galacturônico não estereificados. Sua ação pode ocorrer internamente na cadeia principal (endo-PG), liberando oligômeros, ou na extremidade não redutora (exo-PG), liberando monômeros.

Sabendo do grande destaque do uso de PG no setor industrial, é de suma importância a realização de estudos e caracterização de um fungo que possua alto potencial para produção enzimática, e determinar os parâmetros bioquímicos da PG encontrada, para que haja possíveis aplicações biotecnológicas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Purificar uma poligalacturonase de *Penicillium janthinellum* VI2R3M, bem como investigar suas propriedades bioquímicas e sua aplicação em sucos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Produção enzimática;
- Estudo da influência de fontes de carbono na regulação do complexo pectinolítico
- Purificação de uma poligalacturonase através de processos cromatográficos;
- Determinação da massa molecular e detecção da atividade enzimática por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e não desnaturantes (PAGE);
- Caracterização bioquímica da poligalacturonase purificada quanto ao efeito da temperatura e pH sobre a atividade e estabilidade enzimática;
- Verificação da especificidade ao substrato;
- Análise da influência dos íons metálicos;
- Determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_m$ ,  $V_{máx}$ ,  $K_{cat}$ );
- Verificação do modo de ação da poligalactunase através dos produtos de hidrólise;
- Avaliar a atuação da poligalacturonase purificada na clarificação de sucos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Pectina

A pectina está distribuída principalmente na lamela média da parede celular primária de plantas superiores (PAN et al., 2015). Os polissacáridos, principalmente celulose, hemicelulose e pectina, representam cerca de 90% da massa da parede celular de plantas e os 10% restantes compreendem proteínas estruturais e modificadores de polissacáridos (DAHER & BRAYBOOK, 2015) (Fig.1).

Esta molécula é responsável por conferir a rigidez aos frutos, agindo como um "cimento" entre os "tijolos" celulares de celulose, o qual é quebrado naturalmente pela pectinase quando a fruta passa pelo processo de amadurecimento e torna-se macia (ADAPA et al., 2014; LI et al., 2015). A pectina também está envolvida em várias propriedades da parede celular, tais como a porosidade, carga superficial, pH e equilíbrio de íons, adesão celular, a flexibilidade da parede celular e defesa contra estresses bióticos, incluindo aqueles gerados por plantas parasitas (BONNIN et al., 2014; DAMASIO et al., 2010).

Pectinas são ricas em ácido galacturônico (GalA), acreditando que esta deva consistir em pelo menos 65% deste composto. A homogalacturonana, ramnogalacturonana I e ramnogalacturonana II são os três principais polissacarídeos pectícos que compõem estruturalmente a parede primária de células, todos contendo GalA em maior ou menor quantidade (RIDLEY et al., 2001; WIKIERA et al., 2015).

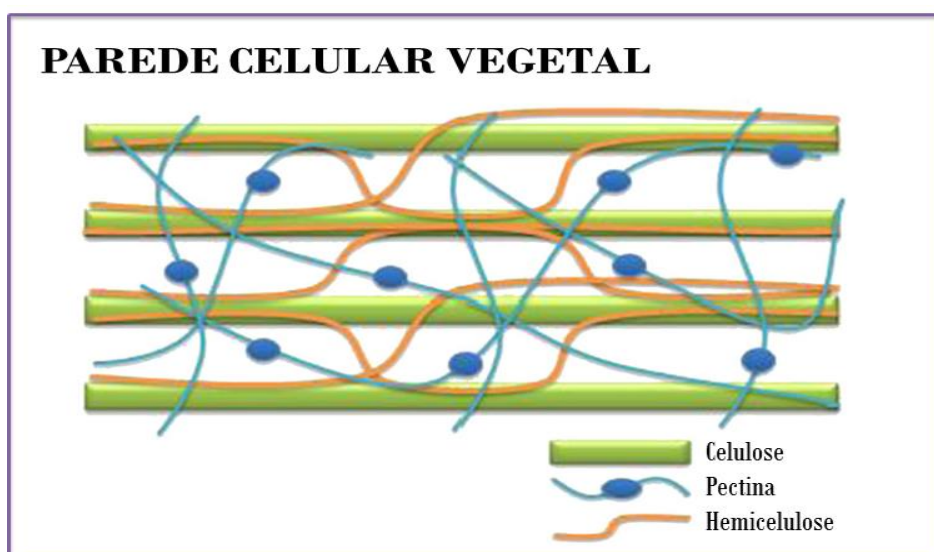


Figura 1 Arranjo de fibras de pectina, juntamente com as fibras de celulose e hemicelulose em uma parede celular de planta (Adapa et al., 2014).



A homogalacturonana (HG) é o mais abundante polissacarídeo péctico na parede celular, correspondente a cerca de 60 a 65% do total da pectina. Apresenta unidades lineares de GalA unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4. Os grupos carboxilas estão parcialmente metil-esterificados (Fig. 2). Já a ramnogalacturonana I (RGI), apresenta uma cadeia constituída pelo dissacarídeo  $[\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-GalA-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha-(1}\rightarrow n\text{.)}$ , ou seja, uma variedade de diferentes cadeias de glicanas (principalmente arabinana e galactana) está ligada às unidades de ramnose. O comprimento das cadeias pode variar consideravelmente e a composição de açúcares de RGI pode ser altamente heterogênea. A RGI representa 20-35% da pectina. O polímero estruturalmente mais complexo é a ramnogalacturonana II (RGI) o qual compõe 10% da pectina e contém porções de açúcares atípicos na cadeia lateral (WASATS et al., 2006; SHARMA et al., 2013; WIKIERA et al., 2015).

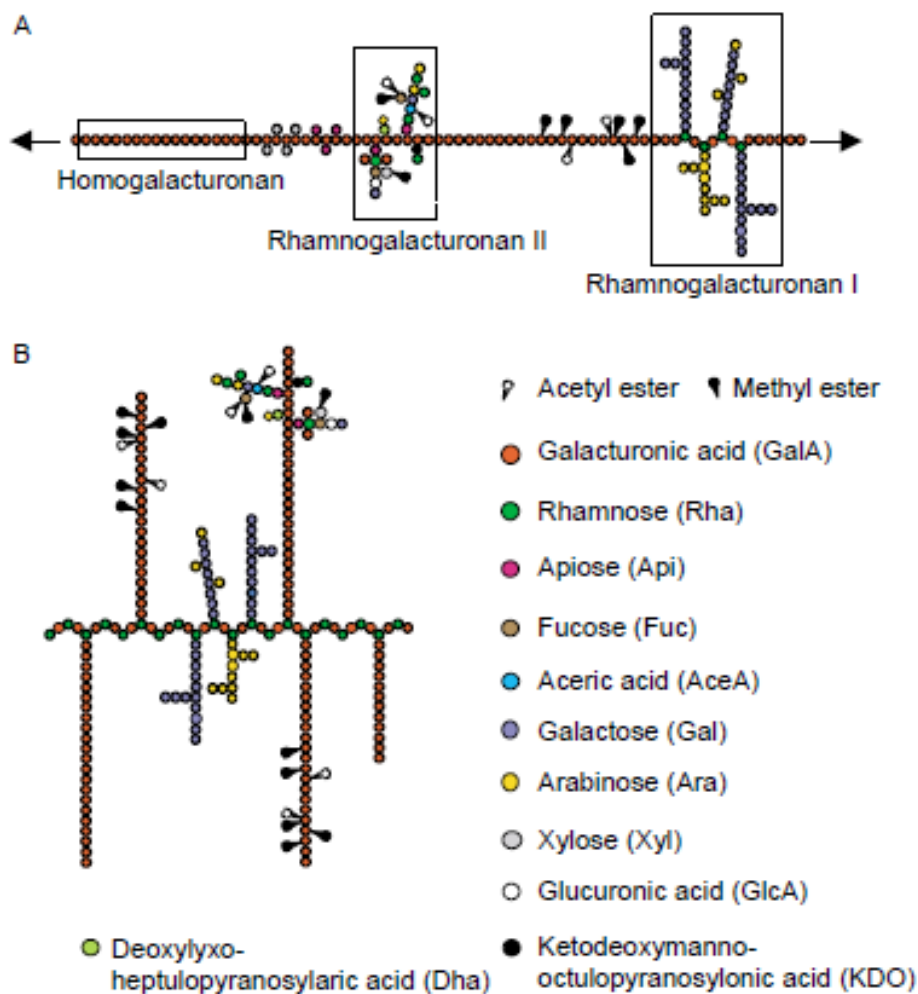


Figura 2 Estrutura básica da pectina: Representação esquemática da estrutura convencional (A) e alternativa (B) proposta para pectina (Wasats et al., 2006).

A pectina é comercialmente extraída da casca de frutas cítricas, bagaço de maçã, resíduos de beterraba, cabeça do girassol e resíduos de manga. O polímero é solúvel em água e exibe viscosidade e capacidade de gelificação que dependem da sua estrutura. À medida que o pH é reduzido, a ionização dos grupos carboxilato é suprimida, resultando em redução de hidratação dos grupos ácidos carboxílicos. Com esta ionização reduzida, a repulsão eletrostática entre as moléculas de polissacarídeo desaparecem e as cadeias formam um gel. Esta propriedade está fortemente ligada ao grau de esterificação de unidades de ácido galacturônico, ao peso molecular, a densidade de carga, a força iônica, ao pH e a presença de outros solutos. Por ser gelificante, espessante e ter propriedades de estabilização, a pectina é útil para uma série de aplicações na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética (KARAKI et al., 2016).

As cadeias laterais da molécula de pectina consistem de L-ramnose, arabinose, galactose e xilose. Os grupos carboxil do ácido galacturônico são parcialmente esterificados por grupos metil e parcialmente neutralizados por íons sódio, potássio ou amônio. Com base no tipo de modificações da cadeia principal, as substâncias pécticas são classificadas em protopectina, ácido péctico, ácido pectínico e pectina.

- Protopectinas são substâncias pécticas e sofrem hidrólise restrita resultando em pectina e pectinas ácidas. Protopectina ocasionalmente é um termo usado para descrever a substâncias pécticas insolúvel em água, encontrada em tecidos vegetais e são usadas para produzir substâncias pécticas solúveis.
- Ácidos pécticos são as galacturonanas que contêm quantidades insignificantes de grupos metoxil. Sais de ácidos pécticos são chamados de pectatos.
- Ácidos pectínicos são galacturonanas com várias quantidades de grupos metoxil. Possuem propriedade única de formarem um gel com açúcar e ácidos ou, se adequadamente com baixo teor de metil, com certos outros compostos, tais como sais de cálcio.
- Pectina é um nome genérico para a mistura de diferentes compostos onde o ácido pectínico é o maior componente. Sua forma nativa está localizada na parede celular e pode estar interligada com outros polissacarídeos estruturais e proteínas para formar a protopectina insolúvel (KASHYAP et al., 2001).

### 3.2 Pectinases

As enzimas são os compostos bioativos que regulam muitas reações químicas nos tecidos vivos (SHARMA et al., 2013). São as proteínas mais notáveis e altamente especializadas e funcionam como catalisadores das reações químicas do sistema biológico, na qual sem sua presença dificilmente aconteceriam. Estas apresentam alto grau de especificidade para os seus substratos, aceleram as reações químicas e atuam em soluções aquosas sob condições suaves de temperatura e pH (NELSON & COX, 2014).

Desde 1940, as pectinases têm sido exploradas para muitas aplicações industriais (GUMMADI & PANDA, 2003). Estas enzimas atuam em inúmeros processos, tais como, remoção e degomagem de fibras vegetais, fermentação de chá e café, extração de óleo, tratamento de águas residuais industriais, clareamento de sucos de frutas e vinhos, subprodutos agroindustriais, na desidratação, lavagem e branqueamento de tecido, preparação de fibras de celulose, modificação da biomassa celulósica para produção de bioetanol, infusão de casca cítrica, indústria de alimentação animal, bem como na indústria de alimento funcional onde são utilizadas na preparação de fibra pectínica como prebiótico ativo. Estas representam cerca de 75% das vendas globais de enzimas que são comercializadas nas indústrias de alimentos (AMIN et al., 2017; TRINDADE et al., 2017; SASSI et al., 2016).

De acordo com seu mecanismo de degradação, as pectinases podem ser divididas em enzimas desesterificantes ou despolimerizantes (GUMMADI & PANDA, 2003). Assim, são classificadas em três categorias: (1) se a enzima utiliza pectina, ácido pectínico ou oligo-D-galacturonato como substrato preferido; (2) se as pectinases agem por hidrólise ou trans-eliminação; (3) se a clivagem é aleatória no interior da cadeia (endo-enzimas) ou nas extremidades (exo-enzimas). Os três principais tipos de pectinases são:

- Protopectinases: Estas enzimas solubilizam protopectina formando pectina solúvel altamente polimerizada.
- Pectinesterases (PE): catalisam a desesterificação do grupo metil da pectina formando ácido pectínico. As enzimas atuam preferencialmente no grupo metil éster da unidade galacturonato próximo a uma unidade galacturonato não esterificada.
- Enzimas despolimerizantes: são subdivididas em hidrolizantes de ligações glicosídicas e clivantes.

- Hidrolizantes de ligações glicosídicas, nestas incluem:
  - a. Polimetilgalacturonases (PMG): catalisam a clivagem hidrolítica da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 da pectina. Estas são subdivididas em endo-PMG (EC 3.2.1.15), que causa clivagem randômica da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 da pectina, preferencialmente, na pectina altamente esterificada e exo-PMG (EC 3.2.1.15), que causa clivagem sequencial da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 da pectina na extremidade não redutora da cadeia da pectina.
  - b. Poligalacturonases (PGs): catalisam a hidrólise da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 do ácido péctico (ácido poligalacturônico). Elas são classificadas em endo-PG (EC 3.2.1.15), que catalisa a hidrólise randômica da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 do ácido péctico e exo-PG (EC 3.2.1.67), que catalisa a hidrólise sequencial da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 do ácido péctico na extremidade não redutora da cadeia.
- Clivantes: clivam a ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 por trans-eliminação, resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada no C4 e C5 na extremidade não redutora do ácido galacturônico formado. Nestas incluem:
  - a) Polimetilgalacturonato Liase (PMGL, EC 4.2.2.10): catalisa a quebra da pectina por clivagem trans-eliminativa. São classificadas em endo-PMGL, que catalisa a clivagem randômica da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 da pectina e exo-PMGL, que catalisa a quebra sequencial da pectina por trans-eliminação na extremidade da cadeia.
  - b) Poligalacturonato Liase (PGL): catalisa a clivagem da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 do ácido péctico por trans-eliminação. São divididas em endo-PGL (EC 4.2.2.2), que catalisa a clivagem aleatória da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 do ácido péctico e exo-PGL (EC 4.2.2.9), que catalisa a clivagem sequencial da ligação glicosídica  $\alpha$ -1,4 do ácido péctico na extremidade da cadeia (KASHYAP et al., 2001; BIZ et al., 2014).

As PGs parecem ser as enzimas pécticas mais frequentemente encontradas. Elas são formadas na maioria dos tecidos vegetais, particularmente em frutos em maturação. Além disso muitos microrganismos patogênicos e plantas saprófitas produzem PGs (JUWON et al., 2012).

### 3.3 Poligalacturonase

Biologicamente, PGs (EC 3.2.1.15) formam uma classe de enzimas com papel importante no crescimento das plantas e nos processos fitoquímicos, isto devido a sua contribuição no amolecimento de frutas através da ação hidrolítica na ligação glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4 na cadeia principal da pectina não esterificada. Além disso, estas enzimas são comercialmente importantes devido ao seu contínuo aumento da demanda nos mercados mundiais para aplicação na indústria de alimentos (NAKKEERAN et al.; 2010; SIEIRO et al., 2014; TAPIAS et al., 2016). Sua maior aplicação encontra-se na clarificação de sucos de frutas, na qual o principal objetivo do tratamento é degradar as substâncias pécticas responsáveis pela turbidez e formação de precipitados após o envasamento do suco (SILVA et al.; 2005; MEYER et al.; 2001).

As poligalacturonases (PGs) são produzidas por vários organismos, como plantas, bactérias e fungos (ANAND, G.; YADAV, S.; YADAV, D., 2017). As poligalacturonases fúngicas são geralmente proteínas monoméricas com teor de carboidrato de 5 a 85% e massas moleculares de 20 a 95 kDa. A maioria são mesofílicas e ácidas, que exibem atividade ótima a 30 - 55 °C e em pH 3,5 - 5,5 (PAN et al., 2015; MA et al., 2016).

Poligalacturonases são classificadas em dois grupos, as enzimas do tipo endo e exo-poligalacturonases. As endo-PG agem em ácido poligalacturônico (PGA) liberando oligossacarídeos de curto grau de polimerização (ácidos tri e tetra-galacturônico) como produtos de hidrólise finais, enquanto exo-PG liberam ácidos monogalacturônico (Fig. 3) (QUIROGA et al., 2009; TOUNSI et al., 2016).

Muitas endo-PGs foram purificadas e caracterizadas a partir de fungos, leveduras, bactérias e, entre as quais, as endo-PGs fúngicas são consideradas como boas candidatas para a produção industrial devido à sua estabilidade em pH que variam de 4,0 a 6,0 (CHENG et al., 2016).

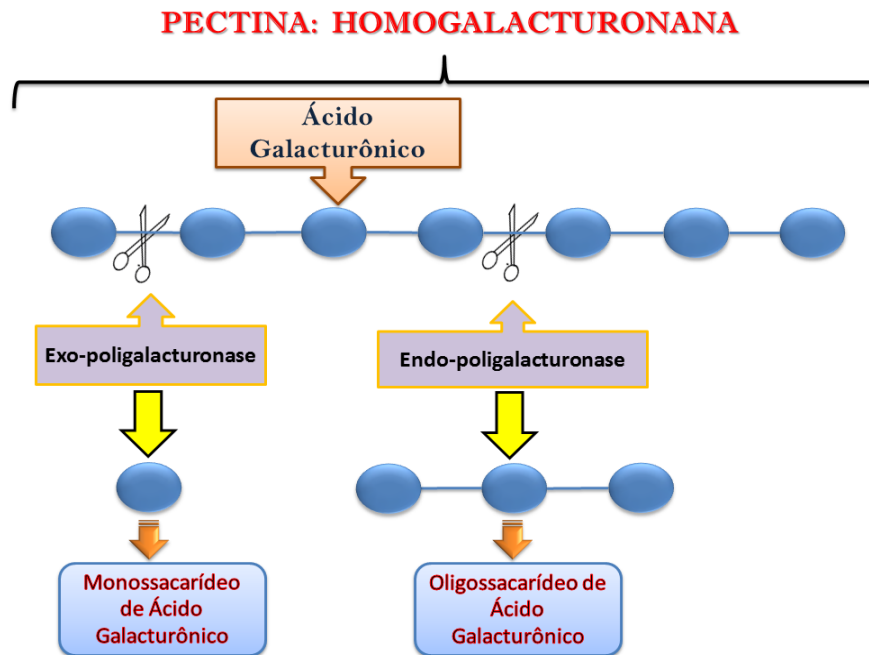


Figura 3 Modo de ação de Endo e Exo-poligalacturonase e seus derivados (modificado de Adapa et al., 2014).

### 3.4 Fontes microbianas de pectinases

As enzimas utilizadas na indústria são obtidas primariamente de microrganismos, dos quais, 50% originam 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). As enzimas microbianas são mais ativas e estáveis que enzimas de plantas e animais. Além disso, os microrganismos representam uma fonte alternativa de enzimas porque elas podem ser cultivadas em grandes quantidades em um curto período de tempo por fermentação e devido à sua diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética (ANBU et al., 2015).

Fontes microbianas das pectinases são utilizadas para a produção industrial e aplicação de vários processos, incluindo clarificação de sucos de frutas, degomagem e maceração de fibras vegetais, tratamento de resíduos pécticos de água, indústria de papel e celulose (PADMA et al., 2011; TORRES et al., 2011; DEY & BANERJEE, 2014). Vários gêneros de microrganismos, tais como *Bacillus*, *Erwinia*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Penicillium* e *Fusarium* são conhecidos como bons produtores de pectinases (ZENI et al., 2011).

O potencial biotecnológico de enzimas pectinolíticas obtidas a partir de fungos tem atraído grande atenção de inúmeros pesquisadores em todo o mundo. Características expostas por fungos filamentosos torna-os bons modelos para

aplicações industriais. Entre alguns deles, é relevante sua capacidade para a fermentação, para produção de grandes quantidades de enzimas extracelulares (vários gramas por litro, em cepas de *Aspergillus*), a viabilidade de cultivo, e o baixo custo de produção em grandes biorreatores. Os fungos filamentosos mais frequentemente utilizados para a produção de enzimas de degradação de polímero são o *Trichoderma reesei* e algumas linhagens de *Aspergillus* e *Penicillium* (MARQUEZ et al., 2011). A produção de pectinases por fungos filamentosos varia de acordo com o tipo de cepa, as condições de cultura (pH, temperatura, aeração, velocidade de agitação e tempo de incubação) e a composição do meio de crescimento (principalmente carbono e fontes de nitrogênio). Por conseguinte, estes têm de ser especificados individualmente para cada linhagem de interesse (GOMES et al., 2011).

Na indústria de suco de frutas, as enzimas produzidas a partir de fungos são amplamente utilizadas, pois além de potentes produtores de enzimas pécicas, o pH ótimo das enzimas destes fungos é muito próximo do pH 3,0 a 5,5, que é o da maioria dos sucos (CHENG et al., 2016; SIDDIQUI et al., 2012). As pectinases com elevada atividade específica à temperaturas mais baixas são favoráveis, uma vez que o risco de crescimento microbiano durante o processamento do suco pode ser minimizado em temperaturas baixas. Assim, pectinases adaptadas ao frio, tais como as PGs de leveduras, apresentam grande potencial para aplicação no processamento de alimentos (YUAN et al., 2011; SASSI et al., 2016).

A caracterização da pectinase é necessária para sua efetiva utilização já que os parâmetros bioquímicos ajudam na determinação da aplicabilidade industrial da enzima. Para aplicações de enzima como catalisador é essencial que ela seja estável, assim estudos enzimáticos estão sendo direcionados para o desenvolvimento de metodologias que possam aumentar a estabilidade da enzima. Do ponto de vista comercial, é primordial a elucidação detalhada dos mecanismos responsáveis pela estabilização e desestabilização de enzimas em temperaturas elevadas (JOSHI et al., 2015).

## 4. CAPÍTULO I

### Purificação, caracterização e aplicação de uma exo-poligalacturonase de *Penicillium janthinellum* VI2R3M

Juliana Pagnonceli, Giovane Bruno Rocha, Letícia Mara Rasbold, Indianara Kawana Bueno, Alexandre Maller.

Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, 85819-110

#### Resumo

Poligalacturonases (PGs) são utilizadas na indústria para o processo de clarificação de sucos de frutas. Uma PG foi obtida a partir de cultivos com fibra da casca de maracujá, como fonte de carbono, contendo o fungo *Penicillium janthinellum* VI2R3M e purificada (3,1 vezes) por cromatografia de troca iônica e gel filtração. A massa molecular relativa da poligalacturonase purificada foi de aproximadamente 102,0 kDa. A enzima apresentou atividade máxima em pH 5,0 e temperatura de 50 °C, mantendo-se 100% estável a 50 °C por 30 minutos e 80% em pH 3,0 a 5,0 por 24 horas. Os parâmetros cinéticos  $K_m$ ,  $V_{max}$  e  $K_{cat}$  para hidrólise da pectina foram de 2,56 mg/mL, 163,1 U/mg e  $277 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. A PG apresentou especificidade para hidrolisar ácido poligalacturônico, com atividade exo-PG liberando ácidos mono-galacturônicos, e considerável aumento de atividade na presença de  $Mg^{2+}$ . Os sucos clarificados com adição de PG, entre eles laranja, maçã e manga apresentaram aumento da transmitância em 35%, 45%, 49%, respectivamente, com redução da cor em 22%, 51%, 55%, respectivamente. Os resultados sugerem que a nova linhagem *Penicillium janthinellum* VI2R3M apresenta alta produção de poligalacturonases e esta enzima possui grande potencial para aplicações biotecnológicas na indústria de sucos.

**Palavras-chave** *Penicillium janthinellum*, poligalacturonase, exo-poligalacturonase, purificação, clarificação

#### Introdução

A pectina é o terceiro polissacarídeo estrutural encontrado na parede celular primária e lamela média das plantas. Contribui para firmeza e estrutura das plantas e é constituída principalmente por cadeias lineares de ácidos 1,4- $\alpha$ -D-galacturônico, que são parcialmente metil ou acetil esterificadas em diferentes graus [1, 2]. A



pectina presente em frutas e legumes permanece na polpa durante a extração do suco, provocando turbidez. O uso de enzimas pectinolíticas (pectinases) na degradação da pectina resulta na clarificação e diminuição da viscosidade, tendo assim aumento no rendimento do suco [3]

A degradação da pectina é facilitada principalmente pelo grupo de enzimas denominadas pectinases. Estas incluem a pectina metil esterase (PME, EC 3.1.1.11), pectina liase (EC 4.2.2.10), endo-poligalacturonase (EC 3.2.1.15) e exo-poligalacturonase (EC 3.2.1.67) [4, 5]. Quando desmetilada, a pectina passa a formar o ácido poligalacturônico (PGA) ou ácido péctico que é o substrato preferido para a maioria das poligalacturonases (PGs) [6].

As pectinases têm diversas aplicações na indústria, especialmente na extração e clarificação de suco de frutas e vinhos, degomagem de fibras vegetais, extração de óleo vegetal, fermentação de café, tratamento de águas residuais e na indústria de alimentação animal [7, 8, 9, 10]. Das pectinases comerciais, a maioria das enzimas são produzidas a partir de fontes fúngicas como *Aspergillus spp* e *Penicillium spp* [4]. Nas indústrias, a principal pectinase utilizada na extração e clarificação de sucos de frutas é a PG, também produzida a partir de fungos [3].

As PGs são classificadas de acordo com sua especificidade ao substrato e a posição das ligações que elas hidrolisam [11]. Quando enzimas do tipo endo-poligalacturonase (endo-PG) atuam sobre o ácido poligalacturônico, elas liberam oligossacarídeos de baixo grau de polimerização (ácidos tri e tetra-galacturônicos) como produtos finais de hidrólise, enquanto a exo-poligalacturonase (exo-PG) libera principalmente ácido mono e di-galacturônico [12].

Há mais de 60 anos, preparações de enzimas pectinolíticas tem sido utilizadas na produção de suco de frutas. Elas são pré-requisito para obtenção de sucos claros e estáveis, com concentrados de alta qualidade, e que proporcionam rendimento satisfatório do suco, juntamente com boa economia de processos [13]. A purificação e a compreensão das propriedades enzimáticas são indispensáveis a fim de explorar as enzimas pécticas como biocatalizadores industriais em algumas áreas específicas. Em vista disso, vários pesquisadores estão focando na purificação, no desempenho catalítico e na estabilidade de enzimas de várias origens [14]. Estudos de purificação e caracterização de várias pectinases de diversas linhagens de *Penicillium* foram documentadas na literatura. No entanto, não há relatos sobre as propriedades bioquímicas, termoestabilidade, cinética e aplicação de uma PG de *P. janthinellum* VI2R3M, isolado de fragmentos florestais de

Mata Atlântica. Considerando isto, o presente estudo relata detalhadamente a produção, purificação e caracterização de uma nova exo-PG da linhagem fúngica *P. janthinellum* VI2R3M e sua aplicação em suco de frutas.

## **Material e Métodos**

### **Microrganismo e Produção Enzimática**

O microrganismo utilizado neste estudo foi o fungo *P. janthinellum* VI2R3M pertencente ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, o qual foi isolado a partir do solo de uma reserva de Mata Atlântica, situado no Refúgio Biológico Bela Vista, localizado no município de Foz do Iguaçu – PR. A determinação de espécie do microrganismo foi realizada pela empresa Helixxa, através do sequenciamento da região não codificadora ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do RNA ribossomal utilizando a técnica de Sanger. A determinação de gênero e espécie fúngica foi conduzida através da comparação da sequência consenso obtida contra a base de dados Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI), utilizando a ferramenta BLAST. A sequência da região de ITS1 a ITS4 do fungo *P. janthinellum* VI2R3M encontra-se depositada com número de acesso MG991257 no GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

O cultivo do fungo foi realizado em meio líquido, na qual 1 mL de suspensão de esporos ( $2,7 \times 10^4$  esporos/mL) foi inoculado em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio Khanna [15], como suplemento mineral, com 1% de diferentes fontes de carbono, e incubado a 28 °C em modo estacionário. Quando a produção enzimática atingiu o seu máximo, no sétimo dia, a cultura foi filtrada sob vácuo com auxílio de bomba de vácuo e papel de filtro Whatman#1, seguida de diálise contra água destilada por aproximadamente 12 horas a 4 °C.

A indução do complexo pectinolítico em meios de cultivo suplementados por resíduos e subprodutos agroindustriais, como palha de arroz, palha de feijão, palha de milho, palha de trigo, fibra da casca de maracujá, bagaço de cana, bagaço de cevada, casca de amendoim, casca de laranja, casca de limão, casca de maçã, casca de batata, resíduo fibroso de mandioca e sabugo de milho, foram investigados por apresentarem alta porcentagem de pectina na sua constituição. Pectina cítrica (Sigma) e glicose foram utilizadas como controles positivo e negativo na produção de PG, respectivamente.

## **Ensaio Enzimáticos**

A atividade da poligalacturonase foi determinada utilizando substrato ácido poligalacturônico 1% (p/v) (Sigma) em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 a 50 °C, por 5 min. Os açúcares redutores produzidos foram quantificados conforme o método de Miller [16]. A unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto, nas condições de ensaio. A atividade específica foi expressa em unidade de atividade total por mg de proteína total (U/mg).

A concentração de proteína (mg/mL) foi determinada em espectrofotômetro a 595 nm pelo método de Bradford [17], empregando-se soro albumina bovina (BSA) como padrão.

## **Purificação da Poligalacturonase**

O extrato enzimático foi equilibrado com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e aplicado na coluna cromatográfica de troca iônica DEAE- Sephadex. Após a lavagem da coluna com o mesmo tampão, as proteínas carregadas negativamente foram eluídas com o gradiente de NaCl 0 a 1 M em tampão. Foram coletadas frações de 5 mL/tubo e determinada a atividade enzimática e o conteúdo proteico. A fração com maior atividade poligalacturonásica foi liofilizada, ressuspenida em 1 mL e aplicada na coluna de gel filtração Sephadex G100, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Foram recolhidas frações de 1 mL e foi determinada a atividade enzimática e o conteúdo proteico. As alíquotas com maior atividade foram reunidas, dialisadas e liofilizadas para testes posteriores. Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4 °C.

## **Determinação da Massa Molecular e Detecção da Atividade da Enzima**

Para verificar a massa molecular da enzima purificada, foi realizada eletroforese em condições desnaturantes como descrita por Laemmli [18], utilizando gel na concentração de 10% de acrilamida. A revelação do gel foi feita com nitrato de prata [19]. Os marcadores de massa molecular foram de 14,4 a 97 kDa da GE Healthcare UK Limited.

Para visualização da atividade da poligalacturonase (zimograma) foi utilizado o mesmo gel de proteínas, porém com amostra não desnaturada. Após a corrida eletroforética o gel foi incubado a 50 °C por 2 horas com substrato (pectina cítrica 1%) e em seguida corado durante 30 minutos com 0,02% de vermelho de rutênio e

lavado com água destilada até a banda de atividade da poligalacturonase ser visualizada como área clara.

### **Efeito da Temperatura sobre a Atividade e Estabilidade Enzimática**

A temperatura ótima de atividade da poligalacturonase foi verificada através da dosagem de açúcares redutores pelo método de Miller [16], em temperaturas que variaram de 30 a 70 °C.

A estabilidade térmica foi observada através da incubação da enzima na ausência do substrato a 50, 60, 70 °C, por até 120 minutos, seguida da quantificação da atividade enzimática através do método de Miller [16].

### **Efeito do pH sobre a Atividade e Estabilidade Enzimática**

A influência do pH na atividade enzimática foi verificada através da solubilização do substrato da reação (ácido poligalacturônico), em tampão McIlvaine (citrato-fosfato 100 mM), variando o pH entre 3,0 e 10,0. Após, foi determinada a atividade enzimática.

A estabilidade do pH foi avaliada incubando a PG purificada em tampão McIlvaine, ajustados em pH diferentes (3-10) a 4 °C por 24 horas, na ausência do substrato. Em seguida, foi determinada a atividade enzimática através do método de Miller [16].

### **Especificidade ao Substrato**

A especificidade da PG purificada ao substrato foi conduzida mediante a incubação da enzima com 1% (p/v) de cada substrato (ácido poligalacturônico, pectina cítrica, carboximetilcelulose – CMC, celulose microcristalina - Avicel<sup>®</sup>, amido e xilano) em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,0 durante 5 minutos a 50 °C. A atividade poligalacturonásica foi determinada pelo método de Miller [16]. Para o cálculo da atividade relativa dos outros substratos, o ácido poligalacturônico foi utilizado como controle (100%) por apresentar maior atividade enzimática.

### **Influência de Íons Metálicos na Atividade da Poligalacturonase**

O efeito dos íons metálicos K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> e Hg<sup>2+</sup> e EDTA na concentração de 1 mM e 2 mM foram avaliadas através da atividade enzimática residual pelo método de Miller [16]. A mistura reacional com EDTA foi utilizada como controle negativo.

## Determinação dos Parâmetros Cinéticos

As equações de Michaelis-Menten foram usadas para determinar o  $K_m$  e  $V_{max}$  da enzima, seguido do cálculo de  $K_{cat}$ . O efeito da concentração do substrato na atividade da PG foi realizado utilizando ácido poligalacturônico como substrato em várias concentrações (0,2 – 20 mg/mL). A atividade enzimática foi determinada em pH e temperatura ideais da enzima. Os dados foram calculados usando o programa Enzyplot [20].

## Análise da Cromatografia em Camada Delgada dos Produtos da Poligalacturonase

Para determinar o modo de ação da PG, os produtos da hidrólise do ácido poligalacturônico foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD). As amostras com o substrato ácido poligalacturônico 1% foram incubadas em banho-maria a 50 °C nos diferentes tempos de reação (5, 15, 30, 60 e 120 minutos). Em seguida foram aplicadas na placa de gel de sílica e a placa de CCD foi colocada na mistura (n-butanol: água destilada: ácido acético (5:3:2 (v / v)) como a fase móvel. No final da migração, a placa foi pulverizada com reagente (0,2% orcinol dissolvido em metanol: ácido sulfúrico (9:1 (v / v)) e após revelado por aquecimento a 100 °C. Os ácidos mono-, di- e trigalacturônico foram usados como padrões, seguido do controle (ácido poligalacturônico 1%) fervido por 3 minutos sem a enzima e das amostras nos diferentes tempos de reação.

## Clarificação de Sucos pela Poligalacturonase Purificada

As frutas utilizadas para o teste foram: maçã gala (*Malus Communis*), manga tommy (*Mangifera indica L.*) e laranja pera (*Citrus sinensis*). O suco foi extraído de duas maçãs com casca (322 g), duas laranjas sem casca (441 g) e uma manga sem casca (311 g) através de um liquidificador com adição de água na proporção 4:1 (fruta:água). A polpa extraída foi filtrada em tamis e em seguida foram adicionadas dez unidades de PG purificada por mililitro de suco e incubadas por 4 horas a 50 °C. O mesmo volume de suco também foi incubado, sem adição de enzimas, e usado como controle. O controle e o suco tratado com PG foram centrifugados a 5.000 rpm por 15 minutos em 4 °C. Os sobrenadantes foram analisados segundo os parâmetros de pH, turbidez (% T660nm) e cor (A420nm), usando um espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis, e comparados ao controle sem adição de enzima.

## Resultados e Discussão

### Produção e Detecção da Poligalacturonase

A produção de PG por *P. janthinellum* VI2R3M teve maior indução por fibra da casca de maracujá (1%) como fonte de carbono em sais de Khanna [15] (Figura 1). Nos últimos anos houve um aumento na tentativa de tornar mais eficiente a utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono em bioprocessos, cuja disposição no meio ambiente causa sérios problemas de poluição. No presente estudo a atividade da PG foi de 74,8 U/mL, sendo superior a atividade de 16,54 U/mL, relatada por Ma et al [11], para uma PG de *P. janthinellum*. Este resultado evidencia que esta linhagem é hiperprodutiva e é adequada para estudos posteriores.

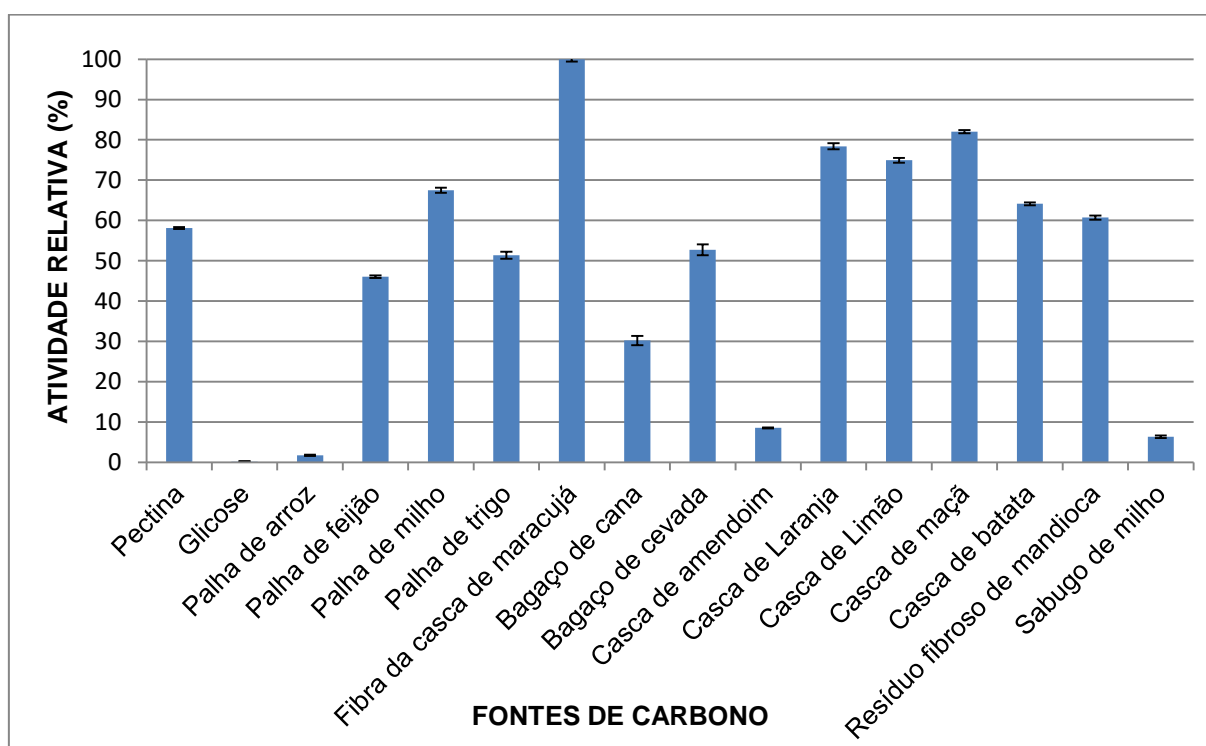


Figura 1 Produção de poligalacturonase em meio Khanna suplementado com fontes de carbono variadas.

### Purificação de uma Poligalacturonase

A PG foi purificada através de colunas cromatográficas em duas etapas: 1) sistema de cromatografia de troca iônica, DEAE-Sephadex e 2) cromatografia de filtração em gel, Sephadex G100 (Tabela 1). Ao final do processo, a enzima foi purificada 3,1 vezes com recuperação de 6,2%. A atividade específica para ácido poligalacturônico (PGA) foi de 110,5 U/mg. Em comparação ao *P. notatum*, ambas

enzimas foram purificadas 3 vezes, porém a PG de *P. notatum* apresentou 27,79 U/mg de atividade específica [14].

A PG purificada foi confirmada por homogeneidade eletroforética em SDS-PAGE (Figura 2). A banda única corresponde a massa molecular relativa de aproximadamente 102,0 kDa, maior que a PG de *P. janthinellum* sw09 de 66,2 kDa descrita na literatura [11]. As PGs de diferentes microrganismos foram relatadas com pesos moleculares variando de 24 kDa a 124 kDa [21, 5]. A análise do zimograma da PG purificada mostrou uma zona de hidrólise na altura da enzima, demonstrando a presença de atividade da PG (Figura 1).

Tabela 1 Tabela de purificação da PG de *Penicillium janthinellum* VI2R3M.

Passos da Purificação	Volume (mL)	Proteína Total (mg totais)	Atividade Total (U totais)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de Purificação (vezes)
Extrato bruto	100	210	7480	35,6	100	1,0
DEAE Sephadex	25	30	1672	55,7	22,6	1,6
Sephadex G100	14	4,2	464	110,5	6,2	3,1

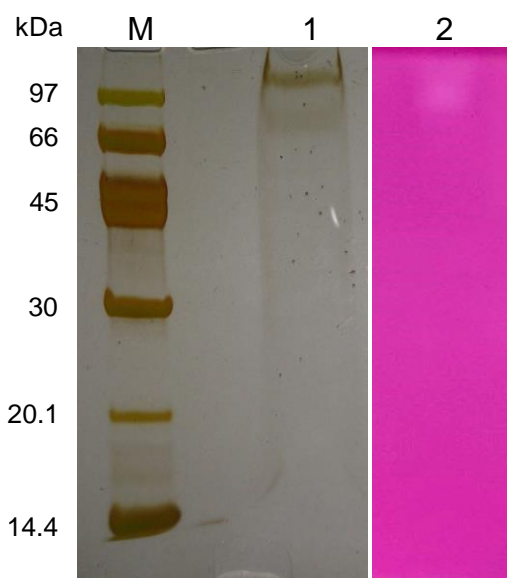


Figura 2 Análise por SDS-PAGE e zimograma da PG purificada: M: Marcador de massa molecular, 1: PG purificada, 2: Detecção da atividade da PG por zimograma com 0,02% de vermelho de rutênio.

### **Efeito da Temperatura e pH na Atividade e Estabilidade da Poligalacturonase**

A temperatura ideal de atividade enzimática foi de 50 °C (Figura 3A). Temperatura semelhante de atividade enzimática foi relatada para a PG de *P. notatum*, *A. niger*, *A. awamori* e *Fusarium graminearum* [14, 5, 8, 22].

Os resultados dos ensaios de termoestabilidade indicaram que a pectinase manteve aproximadamente 100% de sua atividade após a incubação durante 30 minutos a 50 °C e aproximadamente 90% até 2 horas na mesma temperatura (Figura 3B). No entanto, a 60 °C o tempo de meia vida ( $T_{1/2}$ ) foi de aproximadamente 15 minutos e a 70 °C a enzima perde totalmente sua atividade nos primeiros 5 minutos. Este comportamento pode ser explicado pela desnaturação da enzima, na qual o calor tem efeitos complexos nas muitas interações fracas da proteína [6].

Os resultados do efeito do pH sobre a reação enzimática revelaram que a pectinase apresentou maior atividade em pH 5,0 (Figura 3C). Tal pH está na faixa da maioria das pectinases fúngicas descritas, que tem pH ideal entre pH 3,0 e 6,0 sendo este também o pH ótimo do fungo mesófilo *P. janthinellum* sw09 e *P. occitanis* [11, 12].

O efeito do pH na estabilidade de *P. janthinellum* VI2R3M foi investigado incubando a enzima a 4 °C em diferentes pHs por 24 h. Os resultados mostraram que a enzima foi estável em pH de 5,0, mantendo mais de 80% de sua atividade entre o pH 3,0 e 5,0 (Figura 3D). Acima de pH 5,0 a estabilidade da enzima começou a diminuir sendo que acima do pH 9,0 nenhuma atividade foi detectada. A estabilidade do presente estudo está de acordo com Siddiqui et al [23], no qual observaram que a estabilidade máxima da PG era entre o pH 4,0 e 5,0 e acima disto há queda da atividade enzimática. Segundo a classificação descrita por Kant et al [24], esta pectinase pode ser considerada como uma pectinase ácida, a qual sua utilização é mais voltada na clarificação de sucos e vinhos.



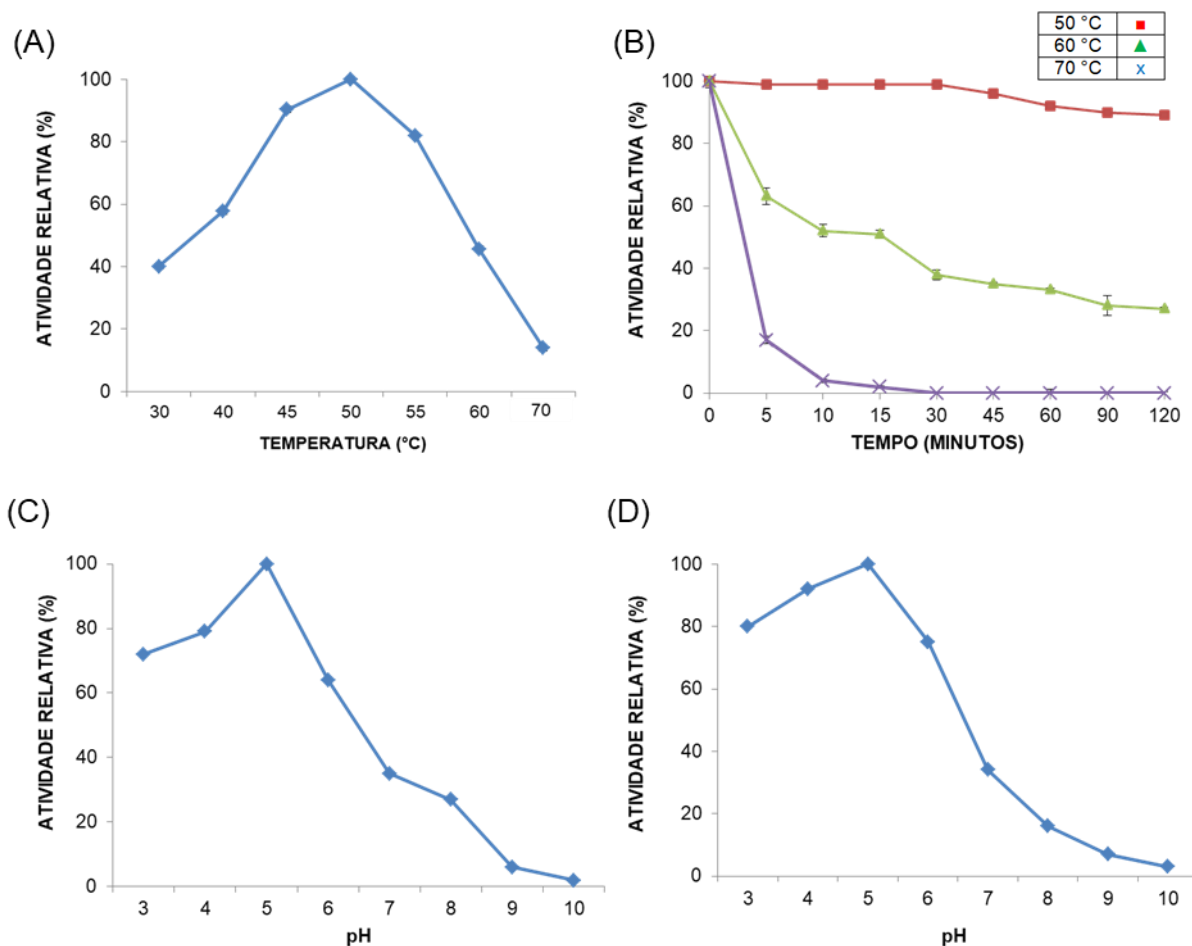


Figura 3 Efeito da temperatura e pH na atividade e estabilidade da PG: (A) Temperatura ótica; (B) Estabilidade da temperatura - Símbolos 50°C (■), 60°C (▲) e 70°C (x); (C) pH ótimo; (D) Estabilidade ao pH.

### Especificidade ao Substrato

A PG purificada exibiu 100% de atividade no ácido poligalacturônico, 55,5% na pectina cítrica e não mostrou atividade com CMC, Avicel<sup>®</sup>, amido e xilano (Tabela 2). Este resultado foi similar a PG do *P. oxalicum* [25] a qual não apresenta atividade com CMC e xilano, sugerindo que a PG de *P. janthinellum* VI2R3M foi especificamente ativa para as ligações do ácido  $\alpha$ -1,4-galacturônico.

Tabela 2 Especificidade ao substrato da PG de *Penicillium janthinellum* VI2R3M.

Substrato	Atividade relativa (%)
Ácido poligalacturônico	100,0
Pectina cítrica	55,5
Carboximetilcelulose – CMC	ND*
Celulose microcristalina – Avicel <sup>®</sup>	ND*
Amido	ND*
Xilano	ND*

\*Não detectado

## Influência de Íons Metálicos na Atividade da Poligalacturonase

O efeito de diferentes íons metálicos sobre a atividade da PG, sob condições ótimas de pH e temperatura são apresentados na Tabela 3. Os resultados indicam que a atividade da PG foi aumentada para 125% na presença de 1 mM de  $Mg^{2+}$ , um aumento semelhante de 130% que foi relatado com o fungo *P. occitanis*. Muitas enzimas necessitam de um componente químico adicional denominado cofator que pode ser um ou mais íons inorgânicos. Enzimas podem ser deficientes de íons, de modo que a adição do íon aumenta a velocidade de reação ou pode ser fator essencial para a reação ocorrer. A atividade enzimática foi levemente inibida por  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  e  $Co^{2+}$ . Segundo Sassi et al [6], a inibição causada por  $Ca^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  é resultado da interação desses íons com a enzima ou com o substrato péctico causando a gelificação ou precipitação do substrato. A maior inibição ocorreu com  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  e  $Hg^{2+}$  no qual também é observada na PG do fungo *P. occitanis* [6, 12].

Tabela 3 Efeito de íons metálicos na atividade da PG de *Penicillium janthinellum* VI2R3M.

Íon metálico	Atividade relativa* (%)	
	1mM	2mM
EDTA (controle)	100,0 ± 2,41	100,0 ± 1,17
$Mg^{2+}$	125,4 ± 0,95	119,2 ± 0,31
$Na^+$	98,3 ± 0,57	88,4 ± 2,80
$Ca^{2+}$	96,8 ± 1,26	79,2 ± 0,90
$K^+$	93,9 ± 1,16	88,5 ± 1,57
$Co^{2+}$	92,0 ± 1,94	74,7 ± 1,12
$Fe^{2+}$	91,1 ± 1,26	63,2 ± 1,65
$Ba^{2+}$	61,8 ± 1,13	28,2 ± 4,12
$Pb^{2+}$	18,4 ± 2,55	10,4 ± 2,89
$Hg^{2+}$	15,5 ± 1,11	3,6 ± 1,40
$Mn^{2+}$	12,6 ± 0,60	0,0 ± 0,55
$Cu^{2+}$	12,3 ± 1,78	4,8 ± 1,17

\* Valores representam a média ± erro padrão de três repetições independentes.

## Parâmetros Cinéticos

O valor de  $K_m$  para degradação do ácido poligalacturônico pela enzima purificada foi de 2,56 mg/mL, sendo superior ao valor de uma exo-PG de *P. janthinellum* (1,74 mg/mL) [11]. Um  $K_m$  muito próximo foi relatado para uma exo-PG de *A. niger* (2,3 mg/mL) [5], e um muito baixo para uma exo-PG de *P. frequentans* (0,059 mg/mL). O  $V_{max}$  detectado neste trabalho (163,1 U/mg) foi maior do que valor a endo-PG de *Achaetomium* sp. Xz8 (97,951 U/mg) [25]. A constante de velocidade

catalítica ( $K_{cat}$ ) encontrada foi de  $277 \text{ s}^{-1}$ , sendo inferior ao valor de  $403 \text{ s}^{-1}$  para uma PG de *Fusarium moniliforme* [26].

### Modo de Ação da Poligalacturonase

Para determinar o modo de ação da PG como uma endo ou exo-enzima, os produtos de hidrólise da reação foram analisados por cromatografia em camada delgada. Conforme ilustrado na Figura 4, foi observado apenas a liberação de ácido mono-galacturônico como resultado de hidrólise e conclui-se que a PG atua como uma exo-PG. Duas exo-PGs de *A. niger* e uma exo-PG de *Pycnoporus sanguineus* foram relatadas na literatura com modo de ação semelhante [27, 9].

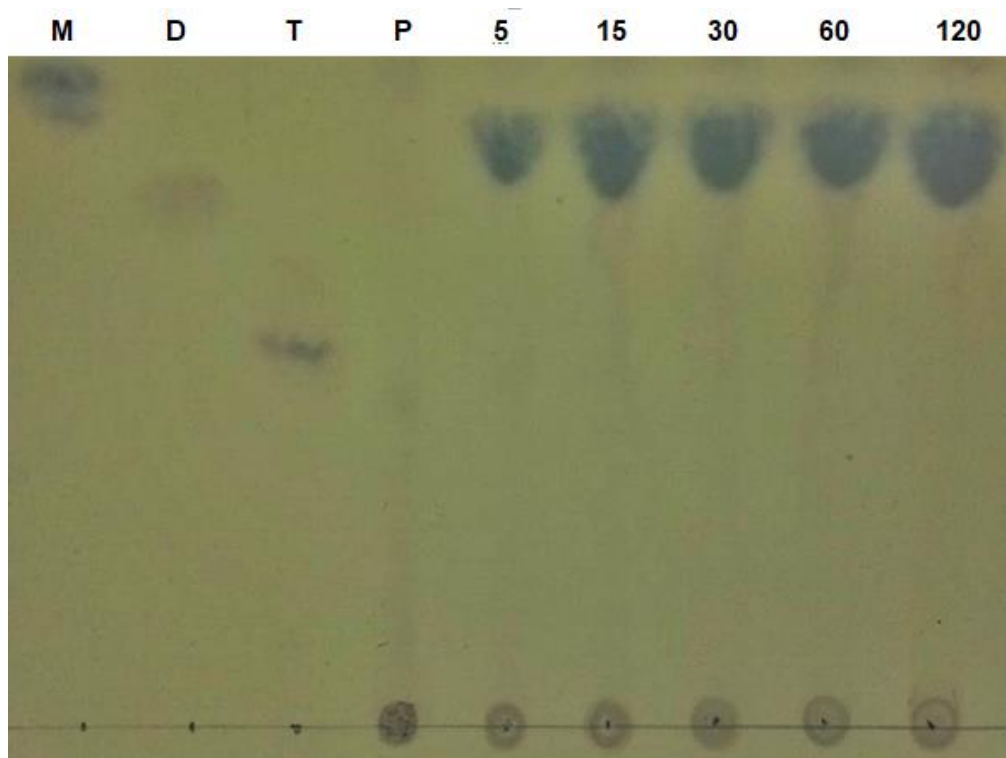


Figura 4 Cromatografia em camada delgada (CCD) da PG purificada de *Penicillium janthinellum* VI2R3M. Símbolos: (M) Padrão de ácido monogalacturônico; (D) Padrão de ácido digalacturônico; (T) Padrão de ácido trigalacturônico; (P) Ácido poligalacturônico 1% - controle; (5) a (9) indicam os tempos de 5, 15, 30, 60, 120 minutos de hidrólise da PG incubada, respectivamente.

### Aplicação da Poligalacturonase Purificada na Clarificação de Sucos

A aplicação da PG purificada na clarificação de sucos de frutas foi estudada nos sucos de laranja (pH 3,5), maçã (pH 4,0) e manga (pH 4,5). A transmitância percentual (%T660) aumentou 35%, 45% e 49%, respectivamente, com redução da cor (%A420) de 22%, 51% e 55% respectivamente (Tabela 4). Este resultado sugere que a PG foi mais eficiente no suco de manga do que de maçã e laranja,

resultando em sobrenadantes mais claros devido à degradação de moléculas de pectina insolúveis em ácido galacturônico solúvel. Na Tabela 4 podemos verificar que a PG não alterou o pH dos sucos durante o tratamento.

Tabela 4 Efeito da PG na clarificação de sucos de laranja, maçã e manga. (Os dados são em relação aos controles sem adição da enzima).

	%T <sub>660</sub>	%A <sub>420</sub>	pH inicial	pH pós tratamento
Suco de laranja	35	22	3,5	3,5
Suco de maçã	45	51	4,0	4,0
Suco de manga	49	55	4,5	4,5

A enzima teve maior ação no suco que apresenta pH 4,5 (manga), o qual é o que mais se aproxima do pH de melhor atividade da enzima (pH 5,0). Porém, a PG purificada é adequada para a clarificação de todos os sucos testados, já que a maioria das bebidas de frutas são de natureza ácida e esta PG apresenta maior estabilidade em pH ácido. O valor da transmitância do suco de laranja pode ser comparável ao de uma exo-PG de *A. niger*, a qual aumentou a transmitância em 27% [5]. Uma PG produzida por *A. niger* tem sido usada para clarificação de suco de banana [28]. Na Figura 5 observa-se a diferença evidente entre as amostras tratadas com a enzima e o controle.

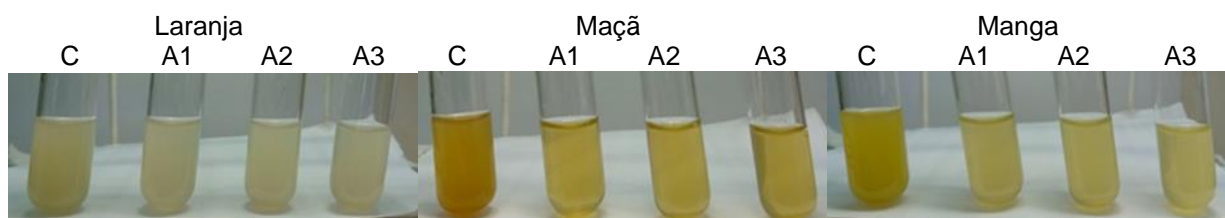


Figura 5 Clarificação de sucos. Símbolos: (C) controle; (A1), (A2) e (A3) amostras tratadas com PG.

## Conclusão

O fungo filamentosso *Penicillium janthinellum* VI2R3M foi eficiente na produção de uma exo-poligalacturonase em meio Khanna suplementado com fibra da casca de maracujá. A utilização deste resíduo agroindustrial para obter a enzima pode contribuir para diminuir os custos de produção da PG. Foi observada massa molecular de 102 kDa com pH e temperatura ótima de 5,0 e 50 °C. O  $K_m$ ,  $V_{max}$  e  $K_{cat}$  da PG purificada foram de 2,56 mg/mL, 163,1 U/mg e 277 s<sup>-1</sup>, respectivamente, e o Mg<sup>2+</sup> melhorou a atividade enzimática. Vale ressaltar que a enzima apresentou excelente atividade e estabilidade em pH ácidos, apresentando ótima atuação na

clarificação de sucos de laranja, manga e maçã, possibilitando uma boa performance em processos industriais.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

A enzima exo-poligalacturonase de *Penicillium janthinellum* VI2R3M purificada neste trabalho apresentou propriedades funcionais interessantes para sua possível aplicação industrial. Mostrou-se altamente ativa em pH 5,0 e temperatura de 50 °C, bem como foi estável em ampla faixa de pH e temperatura. Além disso, o emprego do resíduo de maracujá como indutor e substrato na síntese da enzima exo-poligalacturonase é de grande vantagem por ser abundante e de baixo custo.

Pode-se concluir que a exo-poligalacturonase obtida do fungo isolado da Mata Atlântica do Paraná, *P. janthinellum* VI2R3M, por exibir esse comportamento ácido, possui grande potencial para aplicações biotecnológicas principalmente na indústria de sucos.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na biotecnologia, os fungos apresentam diversas vantagens na produção enzimática, devido seu alto potencial na produção, por serem de fácil manipulação e baixo custo.

As propriedades catalíticas e a estabilidade das proteínas em condições físico-químicas diferentes são muito importantes para melhor compreender suas propriedades bioquímicas e para explorar estas enzimas nos processos industriais.

O Brasil possui uma das mais importantes economias baseadas na agricultura, produzindo e exportando soja, milho, mandioca, café, açúcar de cana, frutas, entre outros. No entanto, a produção destes produtos gera uma grande quantidade de resíduos. Na tentativa de tornar mais eficiente a utilização destes resíduos, a inovação biotecnológica na área de enzimas e a tecnologia de fermentações, vem sendo uma nova perspectiva nos últimos anos. Uma das aplicações em potencial desses resíduos pode ser sua utilização como fonte de carbono em bioprocessos para obtenção de produtos químicos e de produtos de maior valor agregado, como as enzimas.

Este trabalho buscou isolar e selecionar um fungo com potencial produção de poligalacturonase através de uma seleção de fungos mesófilos presentes na coleção de fungos do laboratório e a obtenção da poligalacturonase pura com alto índice de recuperação após os métodos cromatográficos inicialmente propostos. Assim, a descoberta de um fungo filamentoso com alta produção enzimática em meio de cultivo suplementado com resíduo agro-industriais, e uma poligalacturonase com propriedades físico-químicas interessantes, possibilitam uma futura aplicação

industrial através de estratégias que reduzam os custos, que garantam um melhor e maior rendimento, bem como mantenham a atividade enzimática e pureza da proteína.

Muita pesquisa tem sido focada para explorar novas enzimas pécicas e desenvolver estratégias para melhorar suas características catalíticas. Abordagens na engenharia genética, como tecnologia de DNA recombinante, e mutagênese fazem grandes contribuições na redução dos custos de produção e no fornecimento rápido e suficiente de enzimas. Pesquisadores modificam quimicamente as pectinases através do uso de técnicas de imobilização para melhorar suas características catalíticas e termoestabilidade.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### 7.1 Referências bibliográficas da revisão de literatura

ADAPA, V. et al. Cold Active Pectinases: Advancing the Food Industry to the Next Generation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p.2324-2337, 2014.

AMIN, F. et al. Improvement of activity, thermo-stability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo-polygalacturonase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 974-984, 2017.

ANBU, P. et al. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2014. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 816419, 2015.

ANAND, G.; YADAV, S.; YADAV, D. Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 suitable for clarification of orange juice. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 122, Jun 2017.

BIZ, A. et al. Pectinase activity determination: an early deceleration in the release of reducing sugars throws a spanner in the works. **PloS One**, v. 9, p. e109529, 2014.

BONNIN, E.; GARNIER, C.; RALET, M. C. Pectin-modifying enzymes and pectin-derived materials: applications and impacts. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 98, n. 2, p. 519-32, Jan 2014.

CHENG, Z. et al. A novel acid-stable endo-polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028: purification, characterization and application in the beverage industry. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 989-998, 2016.

DAMASIO, A. R. et al. Purification and partial characterization of an exo-polygalacturonase from *Paecilomyces variotii* liquid cultures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1496-507, 2010.

DAHER, F. B.; BRAYBROOK, S. A. How to let go: pectin and plant cell adhesion. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 523, 2015.

DEY, T. B., BANERJEE, R. Application of decolourized and partially purified polygalacturonase and alpha-amylase in apple juice clarification. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 97-104, 2014.

GARG, G. et al. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-13, 2016

GOMES, J. et al. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 281-287, 2011.

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



JOSHI, M et al. Characterization, cinetic, and thermodynamic studies of marine pectinase from *Bacillus subtilis*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 45, p. 205-220, 2015.

JUWON, A. D. et al. Purification, Characterization and Application of Polygalacturonase from *Aspergillus niger* CSTRF. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 8, p. 175-183, 2012.

KARAKI, N. et al. Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, properties, and potential applications: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 90, p. 1-18, 2016.

KASHYAP, D. R. et al. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

LI, Q.; COFFMAN, A. M.; JU, L. K. Development of reproducible assays for polygalacturonase and pectinase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 72, p. 42-48, 2015.

MA, Y. et al. Production, purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Penicillium janthinellum* sw09. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, p. 479-87, 2016

MARQUEZ, L.A. et al. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 859-868, 2011.

MEYER, A. S. et al. Efficiency of enzymatic and other alternative clarification and finig treatments on turbidity and haze in cherry juice. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p.3644-3650, 2001.

NAKKEERAN, E., SUBRAMANIAN, R.; UMESH-KUMAR, S. Purification of polygalacturonase from solid-state cultures of *Aspergillus carbonarius*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, p. 101-106, 2010.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014.

PADMA, P. N., ANURADHA, K., REDDY, G. Pectinolytic yeast isolates for cold-active polygalacturonase production. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, p. 178-181, 2011.

PAN, X. et al. Biochemical characterization of three distinct polygalacturonases from *Neosartorya fischeri* P1. **Food Chemistry**, v. 188, p. 569-75, 2015.

QUIROGA, E. N. et al. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Pycnoporus sanguineus*. **Mycological Research**, v. 113, p. 1404-10, 2009.

RIDLEY, B. L., O'NEIL, M. A., MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, v. 57, p. 929-67, 2001.

SASSI, A. H. et al. A low-temperature polygalacturonase from *Penicillium occitanis*: characterization and application in juice clarification. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 158-164, 2016.

SHARMA, N., RATHORE, M., SHARMA, M. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, p. 45-60, 2013.

SIDDIQUI, M. A., PANDE, V., ARIF, M. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Rhizomucor pusillus* Isolated from Decomposing Orange Peels. **Enzyme Research**, v. 2012, 138634, 2012.

SIEIRO, C. et al. Albarino wine aroma enhancement through the use of a recombinant polygalacturonase from *Kluyveromyces marxianus*. **Food Chemistry**, v. 145, p. 179-185, 2014.

SILVA, E. G. et al. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **Federation of European Microbiological Societies Yeast Research**, v. 5, p. 859-865, 2005.

TAPIAS, Y. A. R. et al. Stabilization by multipoint covalent attachment of a biocatalyst with polygalacturonase activity used for juice clarification. **Food Chemistry**, v. 208, p. 252-257, 2016.

TORRES, S. et al. A colorimetric method to quantify endo-polygalacturonase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 123-128, 2011.

TOUNSI, H. et al. Catalytic properties of a highly thermoactive polygalacturonase from the mesophilic fungus *Penicillium occitanis* and use in juice clarification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 56-66, 2016.

TRINDADE, L. et al. 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**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

WASATS, W. G. T., KNOX, J. P., MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 97-104, 2006.

WIKIERA, A., MIKA, M.; GRABACKA, M. Multicatalytic enzyme preparations as effective alternative to acid in pectin extraction. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 156-161, 2015.

YUAN, P. et al. A novel acidic and low-temperature-active endo-polygalacturonase from *Penicillium sp.* CGMCC 1669 with potential for application in apple juice clarification. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1369-1375, 2011.

ZENI, J. et al. Screening of pectinase-producing microorganisms with polygalacturonase activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 383-392, 2011.

## 7.2 Referências bibliográficas do artigo científico

1. Damásio, A. R. L., Silva, T. M., Maller, A., Jorge, J. A., Terenzi, H. F. & Polizeli, M. L. (2010). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 1496-1507.
2. Tapias, Y. A. R., Rivero, C. W., Gallego, F. L., Guisán, J. M. & Trelles, J. A. (2016). *Food Chemistry*, 208, 252-257.
3. Patil, N. P., Patil, K. P., Chaudhari, B. L. & Chincholkar, S. B. (2012). *Indian Journal of Microbiology*, 52, 240–246.
4. Yuan, P., Meng, K., Huang, H., Shi, P., Luo, H., Yang, P. & Yao, B. (2011) *Food Chemistry*, 129, 1369-1375.
5. Anand, G., Yadav, S. & Yadav, D. (2017) *3 Biotech*, 7, 122.
6. Sassi, A. H., Tounsi, H., Trigui-Lahiani, H., Bouzouita, R., Romdhane, Z. B. & Gargouri, A. (2016). *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 158-164.
7. Trindade, L. V., Desagiacomo, C., Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli, M. L. T. M., Damasio, A. R. L., Lima, A. M. F., Gomes, E., & Bonilla-Rodriguez, G. O. (2016). *BioMed Research International*, 2016, 1-10.
8. Dey, T. B., Banerjee, R. (2014). *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 97-104.
9. Quiroga, N. E., Sgariglia, M. A., Molina, C. F., Sampietro, D. A., Soberón, J. R. & Vattuone, M. A. (2009) *Mycological Research*, 113, 1404-1410.
10. Garg, G., Singh, A., Kaur, A., Singh, R., J . Kaur, J . & Mahajan, R. (2016). *3 Biotech*, 6, 1-13.
11. Ma, Y., Sun, S., Hao, H. & Xu, C. (2016). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88, 479-487.
12. Tounsi, H., Sassi, A. H., Romdhane, Z. B., Lajnef, M., Dupuy, J. W., Lapaillerie, D., Lomenech A. M., Bonneu, M., Gargouri, A. & Hadj-Taieb, N. (2016). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 127, 56-66
13. Bonnin, E., Garnier, C. & Ralet, M. C. (2014) *Applied Microbiology Biotechnology*, 98, 519-532.
14. Amin, F., Bhatti, H. N., Bilal M. & Asgher M. (2017). *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 974-984.
15. Khanna, P., Sundari, S. S. & Kumar, N. J. (1995). *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 11, 242-243.
16. Miller, G. L. (1959). *Analytical Chemistry*, 31, 424-426.
17. Bradford, M. M. (1976). *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

18. Laemmli, U. K. (1970). *Nature*, 227, 680-685.
19. Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. (1987) *Electrophoresis*, 8, 93-99.
20. Leone, F. A. , Baranauskas, J. A. & Ciancaglini, P. (1995). *Biochemical Education*, 23, 35-37.
21. Gomes, J., Zeni, J., Cence, K., Toniazzi, G., Treichel, H. & Valduga, E., (2011). *Food and Bioproducts Processing*, 89, 281-287.
22. Ortega, L.M., Kikot G.E., Rojas N.L., López L.M., Astoreca A.L. & Alconada T.M. (2014) *Journal of Basic Microbiology*, 54, 170-177.
23. Siddiqui, M. A., Pande, V. & Arif, M. (2012). *Enzyme Research*, 2012, Article ID 138634, 8.
24. Kant, S., Vohra, A. & Gupta, R. (2013). *Protein Expression and Purification*, 87, 11-16.
25. Cheng, Z., Chen, D., Lu, B., Wei, Y., Xian, L., Li, Y., Luo, Z. & Huang, R. (2016) *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 989-998.
26. Niture, S.K. & Pant, A. (2004) *Microbiol. Res.*, 159, 305-3014.
27. Sakamoto T., Bonnin E., Quemener B. & Thibault J. F. (2002). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572, 10-18.
28. Barman, S., Sit, N., Badwaik, L. S. & Deka, S. C. (2015). *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3579-3589.