

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS* DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – PCF

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA EXO-
POLIGALACTURONASE DE *Aspergillus terreus* PA3A5T NA CLARIFICAÇÃO
DE SUCOS DE FRUTAS**

GÉSSICA CAROLINE DA SILVA

CASCAVEL – PR
2021

GÉSSICA CAROLINE DA SILVA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA EXO-POLIGALACTURONASE DE *Aspergillus terreus* PA3A5T NA CLARIFICAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Cascavel, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller.

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.¹

Da Silva, Géssica Caroline

Purificação, caracterização e aplicação de uma exopoligalacturonase de *Aspergillus terreus* PA3A5T na clarificação de sucos de frutas / Géssica Caroline Da Silva; orientador Alexandre Maller. -- Cascavel, 2021.

74 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2021.

1. Pectinase. 2. Enzimas pectinolíticas. 3. Enzimas microbianas. 4. Atividade enzimática. I. Maller, Alexandre, orient. II. Título.

¹ Revisão de português, inglês e normas de monografia do PCF por Vanessa Raini de Santana em 10/01/2022.

GESSICA CAROLINE DA SILVA

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA EXO-POLIGALACTURONASE DE *Aspergillus terreus* PA3A5T NA CLARIFICAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

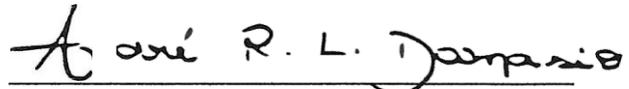
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller.

BANCA EXAMINADORA:



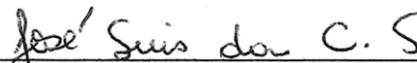
Prof. Dr. Alexandre Maller.

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE
Orientador



Prof. Dr. André Ricardo de Lima Damasio.

Universidade Estadual de Campinas
UNICAMP



Prof. Dr. José Luis da Conceição Silva.

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE

CASCADEL - PR
2021

BIOGRAFIA RESUMIDA

Géssica Caroline da Silva, natural de Salto do Lontra - Paraná, nascida em 7 de fevereiro de 1992, possui graduação em Biomedicina pela Universidade Paranaense – Unipar, *Campus* de Francisco Beltrão - PR (2012). Atualmente, exerce a função de biomédica supervisora na empresa Laboratório Alvaro – Diagnóstico da América S.A (2013 – atual) e é mestranda no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, *Campus* de Cascavel - PR. Desenvolve projeto experimental de dissertação na linha de pesquisa de Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientada pelo Prof. Dr. Alexandre Maller.

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante. ”
Antoine de Saint-Exupéry - O Pequeno Príncipe

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me amparar e iluminar os meus passos em todas as etapas da minha vida.

Aos meus pais, Jair e Janete, por serem meus maiores exemplos de honestidade e determinação, por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos e ser feliz.

À minha irmã, Kamili, que sempre esteve presente e vibrante em todas as minhas conquistas.

Ao meu namorado, Jhonatan, por sempre estar ao meu lado e me apoiar em todas as minhas decisões, por nunca me deixar desistir, mesmo quando os objetivos pareciam inalcançáveis e o cansaço falava mais alto.

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Maller, por toda paciência, suporte e dedicação. Obrigada pela confiança em mim depositada e por me acolher com tanto carinho.

À professora Dra. Marina Kadowaki, por toda ajuda nos experimentos e por cada sugestão de melhoria.

Ao professor Dr. José Luis, por cada palavra amiga e por aceitar participar da minha banca de defesa.

À professora Dra. Márcia Simões, pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Unioeste, em especial à Vitória Delai, Leticia Rasbold, Juliane Almeida, Gabriela Furlaneto, Andreza Gambelli e Paula Rother, por cada momento, cada conversa, cada troca de experiência, cada pausa para o café. Levarei vocês sempre em meu coração.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, instituição pela qual tenho grande admiração e orgulho, por permitir a realização deste sonho.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte do meu processo, o meu muito obrigada!

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA EXO-POLIGALACTURONASE DE *Aspergillus terreus* PA3A5T NA CLARIFICAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS

RESUMO

Com os avanços no setor biotecnológico e crescente demanda para otimizar e diminuir os custos de produção, a utilização de enzimas, principalmente de origem microbiana, tem ganhado força. Dentre essas enzimas, as pectinases têm sido empregadas nos processos de clarificação de sucos de frutas, diminuindo a sua viscosidade e turbidez, permitindo, dessa forma, a obtenção de sucos claros e estáveis de alto valor agregado. Este estudo teve por objetivo purificar, caracterizar e avaliar a aplicação de uma exo-poligalacturonase de *Aspergillus terreus* PA3A5T na clarificação de sucos de frutas. A partir das otimizações das condições de cultivo pela metodologia do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), obteve-se um aumento de 1,45 vezes na atividade enzimática da pectinase, adotando-se como melhor condição o meio Vogel suplementado com 3% de fonte de carbono (casca de maracujá), em temperatura de 28°C, por 120 horas. Para a pectinase presente no extrato bruto, a maior atividade enzimática foi observada a 65°C, em pH 6,0, sendo estável a 40°C em pH ácido. A pectinase purificada apresentou massa molecular relativa de aproximadamente 95,2 kDa, atividade máxima a 70°C em pH 4,0, mantendo-se estável em pH ácido e a 60°C. Os íons FeCl₂, SnCl₂, CoCl₂, ZnSO₄, NaCl, Al₂(SO₄)₃, MgCl₂, MnCl₂ e CuSO₄ induziram a atividade enzimática, enquanto o PbCl₂ inibiu completamente. Os valores de K_m e $V_{máx}$ foram de 1,83 mg mL⁻¹ e 335 U mg⁻¹, respectivamente. A pectinase apresentou alta atividade catalítica sobre o ácido poligalacturônico e nenhuma atividade para o xilano de beechwood e CMC, dessa forma, foi classificada como uma poligalacturonase. A análise dos produtos de hidrólise demonstrou que a enzima foi capaz de liberar apenas monogalacturonato como produto da degradação do ácido poligalacturônico, sendo caracterizada como uma exo-poligalacturonase (EC 3.2.1.67). A exo-PG do *Aspergillus terreus* PA3A5T se mostrou muito eficaz no processo de clarificação dos sucos estudados, com um aumento de 44 e 22% para a transmitância, com redução da cor de 48 e 52% para o suco de laranja e manga, respectivamente.

PALAVRAS-CHAVE: Pectinase, enzimas pectinolíticas, enzimas microbianas, atividade enzimática.

PURIFICATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF A EXOPOLYGALACTURONASE FROM *Aspergillus terreus* PA3A5T IN THE CLARIFICATION OF FRUIT JUICES

ABSTRACT

With advances in the biotech sector and the growing demand to optimize and reduce production costs, the use of enzymes, mainly of microbial origin, has increased. Among these enzymes, pectinases have been used in fruit juice clarification processes, reducing their viscosity and turbidity, thus allowing for clear and stable juices with high added value. This study aimed to purify, characterize and evaluate the application of an exopolygalacturonase from *Aspergillus terreus* PA3A5T in the clarification of fruit juices. From the optimization of the cultivation conditions by the methodology of the Central Composite Rotational Design (CCRD), an increase of 1.45 times in the enzymatic activity of the pectinase was obtained, adopting as the best condition the Vogel medium supplemented with 3% of the source of carbon (passion fruit husk), at a temperature of 28°C, for 120 hours (test 6). For pectinase present in the crude extract, the highest enzymatic activity was observed at 65°C, in pH 6.0, being stable at 40°C in acidic pH. Purified pectinase presented a relative molecular mass of approximately 95.2 kDa, maximum activity at 70°C in pH 4.0, remaining stable in acidic pH and at 60°C. FeCl₂, SnCl₂, CoCl₂, ZnSO₄, NaCl, Al₂(SO₄)₃, MgCl₂, MnCl₂ e CuSO₄ ions induced the enzymatic activity, while PbCl₂ completely inhibited it. The values of K_m and V_{max} were 1.83 mg mL⁻¹ and 335 U mg⁻¹, respectively. Pectinase showed high catalytic activity on polygalacturonic acid and no activity on beech xylan and CMC, thus it was classified as a polygalacturonase. The analysis of the hydrolysis products showed that the enzyme was able to release only monogalacturonate as a degradation product of polygalacturonate, being characterized as an exopolygalacturonase (EC 3.2.1.67). The exo-PG from *Aspergillus terreus* PA3A5T proved to be very effective in the clarification process of the juices studied, with an increase of 44 and 22% for the transmittance, with a color reduction of 48 and 52% for orange and mango juice, respectively.

KEYWORDS: Pectinase, pectinolytic enzymes, microbial enzymes, enzymatic activity.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix	
LISTA DE FIGURAS.....	xi	
1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral.....	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Pectina	17
3.2	Enzimas ativas de carboidratos	19
3.3	Pectinases	20
3.4	Aplicação das pectinases	23
3.5	Pectinases microbianas	25
3.6	Gênero <i>Aspergillus</i> e <i>A. terreus</i>	27
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Microrganismo e manutenção da linhagem de estudo	29
4.2	Determinação da atividade enzimática e concentração de proteínas.....	29
4.3	Otimização das condições de cultivo	29
4.3.1	Efeito do meio de cultivo	29
4.3.2	Efeito do tempo de cultivo	30
4.3.3	Efeito da fonte de carbono.....	31
4.3.4	Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	31
4.4	Extração da pectinase extracelular	31
4.5	Efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade enzimática da pectinase presente no extrato bruto	32
4.6	Purificação da pectinase.....	32
4.6.1	Cromatografia de troca aniônica e exclusão molecular.....	32
4.7	Caracterização bioquímica da pectinase purificada.....	33
4.7.1	Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	33

4.7.2	Efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade enzimática ...	33
4.7.3	Influência dos íons metálicos na atividade da pectinase.....	33
4.7.4	Parâmetros cinéticos da pectinase	34
4.7.5	Especificidade do substrato	34
4.7.6	Análise dos produtos de hidrólise	34
4.8	Aplicação da pectinase purificada	34
4.8.1	Clarificação de sucos de frutas	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Otimização das condições de cultivo	36
5.1.1	Efeito do meio de cultivo	36
5.1.2	Efeito do tempo de cultivo	37
5.1.3	Efeito da fonte de carbono.....	38
5.2	Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	39
5.3	Efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade enzimática da pectinase presente no extrato bruto	48
5.4	Purificação da pectinase.....	50
5.4.1	Cromatografia de troca aniônica e exclusão molecular.....	50
5.5	Caracterização bioquímica da pectinase purificada.....	52
5.5.1	Efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade enzimática ...	52
5.5.2	Influência dos íons metálicos na atividade da pectinase.....	54
5.5.3	Parâmetros cinéticos da pectinase	55
5.5.4	Especificidade ao substrato	55
5.5.5	Análise dos produtos de hidrólise	56
5.6	Aplicação da pectinase purificada	57
5.6.1	Clarificação de sucos de frutas	57
6	CONCLUSÕES	59
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação das pectinases a partir do banco de dados CAZy*.	22
Tabela 2 –	Produção de pectinases por espécies de fungos filamentosos.	26
Tabela 3 –	Meios de cultivo testados para a produção de pectinases pelo <i>Aspergillus terreus</i> PA3A5T.	30
Tabela 4 –	Valores codificados e reais para as variáveis independentes (fonte de carbono, temperatura e tempo) e seu efeito na atividade enzimática da pectinase (U mL^{-1}). O fungo foi submetido a diferentes condições de cultivo com variações na concentração da fonte de carbono (1 – 3,6%), temperatura (28 – 52°C) e tempo de incubação (72 – 136h).	39
Tabela 5 –	Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático de segunda ordem para a atividade enzimática da pectinase (U mL^{-1}).	40
Tabela 6 –	Valores codificados e reais para as variáveis independentes (fonte de carbono, temperatura e tempo) e seu efeito na excreção de proteínas (mg mL^{-1}) pelo <i>A. terreus</i> PA3A5T. O fungo foi submetido a diferentes condições de cultivo com variações na concentração da fonte de carbono (1 – 3,6%), temperatura (28 – 52°C) e tempo de incubação (72 – 136h).	42
Tabela 7 –	Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático de segunda ordem para a excreção de proteínas (mg mL^{-1}).	43
Tabela 8 –	Valores codificados e reais para as variáveis independentes (fonte de carbono, temperatura e tempo) e seu efeito no crescimento micelial (g). O fungo foi submetido a diferentes condições de cultivo com variações na concentração da fonte de carbono (1 – 3,6%), temperatura (28 – 52°C) e tempo de incubação (72 – 136h).	45
Tabela 9 –	Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático de segunda ordem para o crescimento micelial (g).	46
Tabela 10 –	Etapas de purificação da pectinase.	51
Tabela 11 –	Efeito dos íons metálicos nas concentrações de 1 e 10 mmol L^{-1} sobre a atividade da pectinase*.	54
Tabela 12 –	Especificidade ao substrato para a pectinase purificada de <i>Aspergillus terreus</i> PA3A5T. A enzima foi incubada com 1% ($0,01 \text{ g mL}^{-1}$) de cada substrato em tampão acetato de sódio 100 mmol L^{-1} pH 4,0, por 10 minutos, a 70°C*.	56

Tabela 13 – Efeito da pectinase purificada na clarificação dos sucos de laranja e manga segundo os parâmetros de pH, turbidez e cor*.....	57
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação da parede celular vegetal e seus componentes principais. (A) Camas da parede celular vegetal evidenciando a lamela média e as paredes primária e secundária; (B) Principais polissacarídeos da parede primária – Pectina, celulose, hemicelulose e lignina (RYTIOJA et al., 2014). 17
- Figura 2 – Representação da estrutura da pectina destacando seus principais domínios: homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RG I), ramnogalacturonana II (RG II), xilogalacturonana (XGA), apiogalacturonana (AGA) (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006; AHMED; THAKUR; GOYAL, 2021). 19
- Figura 3 – Ação das principais enzimas do complexo pectinolítico sobre os domínios (Homogalacturonana e ramnogalacturonana I) da cadeia de pectina (Adaptado de GLASS et al., 2013). 23
- Figura 4 – Representação esquemática da morfologia do *Aspergillus* spp. (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017). 27
- Figura 5 – Aspecto macroscópico e microscópico do *Aspergillus terreus* (COMACLE et al., 2016). 28
- Figura 6 – Efeito do meio de cultivo sobre a atividade pectinolítica. O fungo foi cultivado em fermentação submersa (FSm) nos meios: Adams (ADAMS, 1990), Czapek (WIZEMAM, 1975), Khanna (KHANNA et al., 1995), Klusen (PERALTA et al., 1990), SR (RIZZATTI et al., 2001) e Vogel (VOGEL, 1964), suplementados com 1% de pectina cítrica (Sigma®) por 7 dias a 28°C. 36
- Figura 7 – Efeito do tempo de cultivo sobre a atividade da pectinase. O melhor tempo para a produção enzimática foi avaliado mediante incubação de 1 mL de suspensão de esporos em meio Vogel (VOGEL, 1964) contendo 1% de fonte de carbono, a 28°C, em modo estacionário, durante 7 dias. 37
- Figura 8 – Efeito da fonte de carbono sobre a atividade pectinolítica. O fungo foi inoculado em meio Vogel (VOGEL, 1964), suplementado com 1% de diferentes fontes de carbono, a 28°C por 96 horas. A pectina cítrica (Sigma®) foi utilizada como controle positivo para a produção de pectinases. 38

Figura 9 – Gráfico de Pareto com as variáveis que influenciaram a atividade enzimática da pectinase.....	41
Figura 10 – Superfície de resposta para a atividade enzimática da pectinase. (A) Fonte de carbono (%) x tempo (H); (B) Temperatura (°C) x fonte de carbono (%); (C) Tempo (h) x Temperatura (°C).....	42
Figura 11 – Gráfico de Pareto com as variáveis que influenciaram a excreção de proteínas.	44
Figura 12 – Superfície de resposta para a excreção de proteínas. (A) Fonte de carbono (%) x tempo (h); (B) Temperatura (°C) x fonte de carbono (%); (C) Tempo (H) x Temperatura (°C).....	45
Figura 13 – Gráfico de Pareto com as variáveis que influenciaram o crescimento micelial.	47
Figura 14 – Superfície de resposta para o crescimento micelial. (A) Fonte de carbono (%) x tempo (h); (B) Temperatura (°C) x fonte de carbono (%); (C) Tempo (H) x Temperatura (°C).....	48
Figura 15 – Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática da pectinase presente no extrato bruto. (A) Temperatura ótima; (B) Estabilidade térmica. A temperatura ótima foi avaliada pela dosagem da atividade enzimática de 30 a 90°C. A estabilidade térmica foi determinada a partir da incubação da enzima sem substrato nas temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C, por até 120 minutos, seguida da dosagem de atividade enzimática. Símbolos: (●) 40°C, (■) 50°C, (▲) 60°C e (◆) 70°C.	49
Figura 16 – Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática da pectinase presente no extrato bruto. (A) pH ótimo; (B) Estabilidade do pH. O pH ótimo foi verificado através da solubilização do substrato da reação (pectina cítrica), em tampão citrato-fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , variando o pH entre 3,0 e 9,0, seguida pela dosagem da atividade enzimática. A estabilidade do pH foi avaliada a partir da incubação da enzima na ausência de substrato em mesmo tampão, variando o pH entre 3,0 e 9,0, a 4°C por 24 horas. Após esse período, a atividade enzimática foi determinada.	50
Figura 17 – Perfis cromatográficos obtidos em (A) coluna DEAE-Sephadex e (B) Sephacryl S-100 HR. O extrato enzimático extracelular dialisado foi equilibrado com tampão Tris-HCl 200 mmol L ⁻¹ pH 7,2 e aplicado na	

coluna de troca aniônica DEAE-Sephadex. As frações que apresentaram maior atividade pectinolítica foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e aplicadas na coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 HR, previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 4,0.51

Figura 18 – (A) Massa molecular da enzima; (B) Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), com a presença de uma única banda de aproximadamente 95,2 kDa. O SDS-PAGE foi realizado em gel de empilhamento de 6% e gel de resolução de 10%, 120 V e 40 mA. O marcador de peso molecular usado foi o PageRuler Plus Prestained da Thermo Scientific™, 10–250 kDa. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 e o peso molecular foi estimado usando o software OriginPro 9.0. Símbolos: (M) Marcador molecular; (A) Enzima purificada.51

Figura 19 – Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática da pectinase purificada. (A) Temperatura ótima; (B) Estabilidade térmica. A temperatura ótima foi avaliada pela dosagem da atividade enzimática de 40 a 80°C. A estabilidade térmica foi determinada incubando a enzima sem substrato nas temperaturas de 50, 60 e 70°C por até 120 minutos, seguida da dosagem da atividade enzimática. Símbolos: (●) 50°C, (■) 60°C, (▲) 70°C.52

Figura 20 – Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática da pectinase purificada. (A) pH ótimo; (B) Estabilidade do pH. O pH ótimo foi verificado por meio da solubilização do substrato em tampão citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹, variando o pH entre 3,0 e 9,0, seguido da dosagem da atividade enzimática. A estabilidade em pH foi avaliada incubando a enzima na ausência do substrato no mesmo tampão e pH, a 4°C, por 24 horas. Após esse período, a atividade enzimática foi determinada.....53

Figura 21 – Cromatografia em camada delgada (TLC) da enzima purificada de *Aspergillus terreus* PA3A5T. (1) Ácido monogalacturônico (1 mg mL⁻¹); (2) Ácido digalacturônico (1 mg mL⁻¹); (3) Ácido trigalacturônico (1 mg mL⁻¹); (4) Ácido poligalacturônico a 1%; (5), (6), (7) e (8) Reação incubada por 10, 30, 60 e 1440 minutos (24 horas), respectivamente. Os produtos da hidrólise foram analisados incubando a enzima com ácido poligalacturônico (0,01 g mL⁻¹) em tampão de acetato de sódio (100

mmol L⁻¹; pH 4,0) a 70°C por diferentes períodos de tempo, seguido de aplicação em CCD. A fase móvel consistiu de n-butanol: etanol: água destilada (50:25:25) e a revelação se deu com orcinol 0,2% em ácido sulfúrico: solução de metanol (1:9) a 100°C.....56

Figura 22 – Clarificação de (A) suco de laranja e de (B) manga. (C) Controle; (A1), (A2) e (A3) Amostras tratadas com pectinase purificada. Os sucos foram obtidos a partir da trituração da polpa da fruta no liquidificador com adição de água na proporção de 4: 1 (fruta: água). A polpa extraída foi peneirada e, em seguida, foram adicionados 2,5 U mL⁻¹ de enzima por mL de suco, seguido de incubação a 70°C por 4 horas. O controle foi o suco incubado sem enzimas. Os sucos tratados foram centrifugados a 5.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C, e os parâmetros de pH, turbidez (% T660nm) e cor (A420nm) foram avaliados.58

1 INTRODUÇÃO

A pectina é um polissacarídeo ácido de alto peso molecular, encontrado principalmente na lamela média da parede celular primária das plantas superiores. Sua presença nos sucos de frutas representa um desafio nos processos de clarificação, devido à sua resistência à degradação e alta viscosidade. Como alternativa, enzimas pectinolíticas (pectinases) têm sido empregadas nos processos de despectinização de vários sucos, diminuindo a sua viscosidade e turbidez. Esse tratamento possibilita a obtenção de sucos mais claros e estáveis, com concentrados de alta qualidade e rendimento satisfatório.

As pectinases constituem um grupo complexo de enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas α (1→4) da pectina por reações de desesterificação ou despolimerização. Dentre essas enzimas, as exo-poligalacturonases (exo-PGs) atuam sobre o ácido poligalacturônico, liberando monômeros de ácido D-galactopiranosilurônico (GalpA) como produto.

Em 2017, o mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 7,1 bilhões e, até 2024, deverá chegar à marca de US\$ 10,5 bilhões, com uma taxa de crescimento anual de 5,7%. No mesmo ano, estimou-se que cerca de 70% da quota de mercado de enzimas era produzida por microrganismos.

Os fungos filamentosos são a principal fonte de enzimas extracelulares utilizadas nos processos industriais. Em comparação às enzimas de origem animal ou vegetal, as de origem microbiana apresentam menor custo de produção, são facilmente produzidas em larga escala em um período relativamente curto de tempo, possibilitam a manipulação genética, além de representarem um recurso renovável.

O *Aspergillus terreus* é um fungo filamentoso saprófita e cosmopolita, podendo ser facilmente isolado do solo, água, vegetações, materiais em decomposição e ar. Economicamente, esse microrganismo tem sido empregado na produção de fármacos (com destaque para a Lovastatina[®]), enzimas e ácidos orgânicos.

Embora alguns estudos tenham relatado recentemente a capacidade de secreção de enzimas do complexo pectinolítico pelo *Aspergillus terreus*, este é o primeiro estudo que caracterizou a molécula bioquimicamente e avaliou a aplicação de uma exo-poligalacturonase produzida por essa espécie na clarificação de sucos de frutas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Evidenciar a capacidade de produção de uma pectinase pelo *Aspergillus terreus* PA3A5T, caracterizar essa molécula bioquimicamente e avaliar a sua ação na clarificação de sucos de frutas.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições de cultivo para a produção de pectinase pelo *A. terreus* PA3A5T;
- Avaliar o efeito da temperatura e pH na atividade e estabilidade enzimática da pectinase presente no extrato bruto;
- Purificar a pectinase através das colunas cromatográficas;
- Caracterizar a enzima purificada quanto à massa molecular, ao efeito da temperatura e pH na atividade e estabilidade, à especificidade do substrato, aos produtos de hidrólise, ao efeito dos íons metálicos e aos parâmetros cinéticos.
- Aplicar a pectinase purificada na clarificação de sucos de frutas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Pectina

A pectina é um polissacarídeo ácido de alto peso molecular, formado basicamente por resíduos de D-galactopiranosilurônico (GalpA) (ácido galacturônico) unidos entre si por ligações α (1 \rightarrow 4), parcialmente esterificados por grupos metilas parcial ou completamente neutralizados por íons sódio, potássio ou amônio (KASHYAP et al., 2001; UENOJO; PASTORE, 2007). Esse polissacarídeo junto com a celulose, hemicelulose e lignina constituem a lamela média da parede celular primária de plantas superiores, em que estão interligados por ligações covalentes e/ou não-covalentes, formando uma intrincada rede que fornece suporte estrutural à planta e resistência a ataques microbianos (DA COSTA, 2019) (Figura 1).

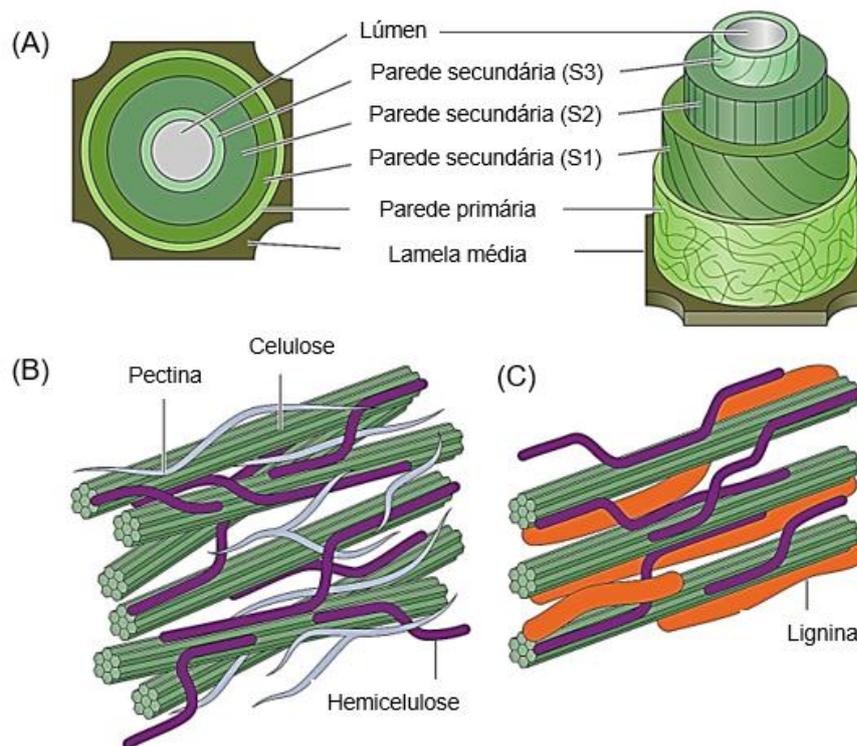


Figura 1 – Representação da parede celular vegetal e seus componentes principais. (A) Camas da parede celular vegetal evidenciando a lamela média e as paredes primária e secundária; (B) Principais polissacarídeos da parede primária – Pectina, celulose, hemicelulose e lignina (RYTIOJA et al., 2014).

A pectina é essencialmente formada por cinco domínios interligados entre si: Homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RG I), ramnogalacturonana II (RG II), xilogalacturonana (XGA) e apiogalacturonana (AGA) (XIAO et al., 2016; AHMED; THAKUR; GOYAL, 2021).

A homogalacturonana (HG) é o polissacarídeo péctico mais abundante da parede celular, correspondendo a aproximadamente 65% do total da pectina. É composto por unidades de D-galactopiranosilurônico (GalpA) unidas entre si por ligações α (1 \rightarrow 4), com os grupos carboxilas parcialmente esterificados com o grupo metil. As cadeias também podem ser acetiladas nas posições O-2 e O-3, dependendo da função vegetal (WONG, 2008).

A ramnogalacturonana I (RG I) é um heteropolímero constituído por monômeros de ácido D-galactopiranosilurônico (GalpA) e ramnopiranosil (Rhap) [\rightarrow 4)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2) - α -L-Rhap-(1 \rightarrow), em que uma variedade de diferentes cadeias de glicanas (principalmente arabinana e galactana) estão ligadas às unidades de ramnopiranosil. O comprimento das cadeias pode variar consideravelmente e a composição de açúcares de RG I pode ser altamente heterogênea, representando cerca de 20-35% da pectina (NAKAMURA et al., 2002; ATMODOJO et al., 2013).

A ramnogalacturonana II (RG II) é o polímero péctico mais complexo, constituindo cerca de 10% da estrutura da pectina. À cadeia lateral estão ligados até 11 tipos de açúcares, incluindo: ácido galactopiranosilurônico (GalpA), ramnose (Rha), apiose (Api), fucose (Fuc), ácido acérico (AceA), galacturose, (Gal), arabinose (Ara), xilose (Xyl), ácido glucônico (GlcA), ácido cetodeoximano-octulopiranosilônico (Kdo) e ácido deoxi-lixoheptulo piranosilárico (Dha) (WONG, 2008; SHARMA, N.; RATHORE; SHARMA, M., 2013; ATMODOJO et al., 2013).

A xilogalacturonana (XGA) é uma homogalacturonana (HGA) carregada com várias quantidades de substituições de β -D-xilose na posição O-3 dos resíduos de GalpA da cadeia principal. A apiogalacturonana (AGA) é caracterizada pela presença de apiose ou apiofuranosil oligossacarídeo na posição O-2 do ácido D-galactopiranosilurônico (AVCI; PEÑA; O'NEILL, 2018; AHMED; THAKUR; GOYAL, 2021).

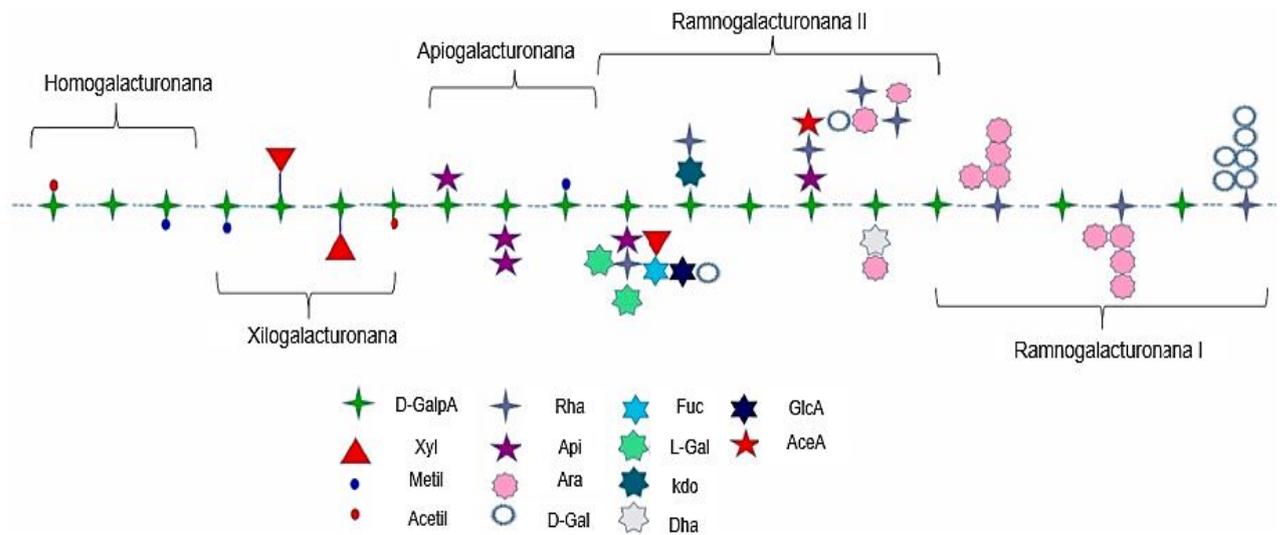


Figura 2 – Representação da estrutura da pectina destacando seus principais domínios: homogalacturonana (HG), ramnogalacturonana I (RG I), ramnogalacturonana II (RG II), xilogalacturonana (XGA), apiogalacturonana (AGA) (WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006; AHMED; THAKUR; GOYAL, 2021).

Abreviações: D-GalpA: ácido galactopiranosilurônico; Xyl: xilose; Rha: ramnose; Api: apiose; Ara: arabinose; D-Gal: D-galactose; Fuc: fucose; L-Gal: L-galactose; Kdo: ácido cetodeoximano-octulopiranosilônico; Dha: ácido deoxi-lixoheptulo piranosilárico; GlcA: ácido glucônico; AceA: ácido acérico

3.2 Enzimas ativas de carboidratos

As enzimas que degradam ou que modificam os polissacarídeos vegetais são classificadas como enzimas ativas de carboidratos (CAZymes) e, de acordo com sua sequência de aminoácidos e similaridade estrutural, são agrupadas em cinco famílias no banco de dados Carbohydrate Active Enzyme (CAZy) (<http://www.cazy.org>): (i) Glicosídeo hidrolases (GHs): enzimas que hidrolisam as ligações glicosídicas entre dois ou mais carboidratos; (ii) Glicosiltransferases (GTs): enzimas responsáveis pela formação ou biossíntese das ligações glicosídicas; (iii) Polissacarídeo liases (PLs): enzimas que clivam as cadeias de polissacarídeos por um mecanismo de β -eliminação; (iv) Carboidrato esterases (CEs): enzimas que catalisam a desesterificação de polissacarídeos metil ou acetilesterificados; e (v) Atividades auxiliares (AAs): enzimas que degradam a lignina e clivam a ligação mono-oxigênio do polissacarídeo (LOMBARD et al., 2014).

De acordo com o banco de dados CAZy, até o momento, são conhecidas 172 famílias de GHs, 114 famílias de GTs, 42 famílias de PLs, 19 famílias de CEs e 17 famílias de AAs.

3.3 Pectinases

As pectinases constituem um grupo complexo de enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas da pectina, por reações de desesterificação (esterases) ou despolimerização (hidrolases e liases) (Figura 3) (BIZ et al., 2016). Assim, de acordo com o banco de dados CAZy, as pectinases desesterificantes pertencem à classe das carboidrato esterases (CEs) e as despolimerizantes, às classes das glicosídeo hidrolases (GHs) e polissacarídeo liases (PLs). A seguir, são apresentadas as principais classes de pectinases e suas respectivas famílias.

- GH28

A. Protopectinase tipo A (PPase-A) (EC 3.2.1.-): atua no domínio homogalacturonana (HG) parcialmente metilesterificado da protopectina, formando a pectina solúvel altamente polimerizada (JAYANI et al., 2005; UENOJO; PASTORE, 2007; ZHANG et al., 2018).

A. Poligalacturonase (PG): catalisa a clivagem hidrolítica das ligações α (1 \rightarrow 4) do ácido poligalacturônico (pectina não-esterificada) e subdivide-se em:

i. Endo-poligalacturonase (endo-PG) (EC 3.2.1.15): hidrolisa de forma aleatória as ligações α (1 \rightarrow 4) entre os resíduos de ácido galactopiranosilurônico, liberando oligogalacturonatos.

ii. Exo-poligalacturonase (exo-PG) (EC 3.2.1.67): catalisa a hidrólise das cadeias a partir da extremidade não redutora, liberando monômeros de ácido galactopiranosilurônico como produto (ANAND; YADAV, S.; YADAV, D., 2017).

B. Polimetilgalacturonase (PMG) (EC 3.2.1.-): catalisa a quebra das ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) entre os resíduos de GalpA da pectina altamente esterificada por β -eliminação. Esta é subdividida em:

i. Endo-polimetilgalacturonase (endo-PMG) (EC 3.2.1.15): cliva aleatoriamente as ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4), liberando oligogalacturonato como produto.

ii. Exo-polimetilgalacturonase (exo-PMG) (EC 3.2.1.15): cliva as ligações glicosídicas α (1 \rightarrow 4) na extremidade não redutora da cadeia, liberando monogalacturonato como produto (BIZ et al., 2014).

C. Ramnogalacturonana galacturonohidrolase (RGGH) (EC 3.2.1.173):

catalisa a clivagem hidrolítica das ligações α (1→2) entre os resíduos de ácido D-galactopiranosilurônico (GalpA) e ramnopiranosil (Rhap) no domínio ramnoglacturonana (RG I) da pectina, a partir da extremidade não redutora da cadeia (COENEN et al., 2007).

- D. Ramnoglacturonana hidrolase (RGH) (EC 3.2.1.171): hidrolisa, de forma aleatória, as ligações glicosídicas α (1→4) entre os resíduos de GalpA e Rhap na cadeia da RG I, liberando oligoglacturonatos como produto (RYTIOJA et al., 2014).
- E. Hidrolase de xiloglacturonana (XGH) (EC 3.2.1.-): catalisa, de forma aleatória, a clivagem das ligações glicosídicas α (1→4) nos resíduos de GalpA e nas substituições de β -D-xilose da cadeia de xiloglacturonana (XGA) (RYTIOJA et al., 2014).
- GH78, -106
 - A. Ramnoglacturonana ramnohidrolase (RGRH) (EC 3.2.1.174): catalisa, por mecanismo de inversão, a hidrólise das ligações glicosídicas α (1→4) entre os resíduos de ácido D-galactopiranosilurônico (GalpA) e ramnopiranosil (Rhap) no domínio ramnoglacturonana (RG I) da pectina a partir da extremidade não redutora da cadeia (WONG, 2008).
 - B. α -L-ramnosidase (RHA) (EC 3.2.1.40): hidrolisa as ligações glicosídicas α (1→4) entre os resíduos de α -L-ramnose na extremidade não redutora da cadeia de RG I (WONG, 2008; SHI et al., 2014).
- CE8
 - A. Pectina metilesterase (PME) (3.1.1.11): catalisa a desesterificação da pectina metilesterificada, formando a pectina com baixo grau de esterificação (ácido poliglacturônico) e metanol. A PME é a primeira enzima a atuar sobre a cadeia de pectina, favorecendo a ação de outras enzimas despolimerizantes como as hidrolases e liases (RAJULAPATI; GOYAL, 2017).
- CE12, -13, -16
 - A. Pectina acetilesterase (PAE) (EC 3.1.1.6): catalisa a desesterificação da pectina acetilesterificada, especificamente no domínio de homogalacturonana (HG), formando ácido poliglacturônico e etanol (DING et al., 2019; AHMED; THAKUR; GOYAL, 2021).
 - B. Ramnoglacturonana acetilesterase (RGAE) (EC 3.1.1.86): catalisa a desesterificação da pectina acetilesterificada, particularmente no

domínio de ramnogalacturonana I, formando ácido poligalacturônico e etanol (DING et al., 2019; WONG, 2008).

- PL1, -3, -9
 - A. Pectato liase (PGL): catalisa a clivagem da ligação glicosídica α (1→4) do ácido poligalacturônico. A PGL subdivide-se em:
 - i. Endo-pectato liase (endo-PGL) (EC 4.2.2.2): realiza a clivagem aleatória da ligação glicosídica α (1→4) do ácido poligalacturônico, liberando oligogalacturonatos insaturados.
 - ii. Exo-pectato liase (exo-PGL) (EC 4.2.2.9): catalisa a clivagem sequencial do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não redutora da cadeia, liberando monogalacturonatos insaturados como produto (BIZ et al., 2014; WU et al., 2020).
 - B. Pectina liase (PNL) (EC 4.2.2.10): catalisa a clivagem das ligações glicosídicas α (1→4) da pectina altamente metilesterificada de forma aleatória na cadeia (AHMED; THAKUR; GOYAL, 2021).
- PL4, -11, -26
 - A. Ramnogalacturonana liase (RGL): catalisa a clivagem das ligações glicosídicas α (1→4) entre os resíduos de ácido D-galactopiranosilurônico (GalpA) e ramnopiranosil (Rhap) no domínio ramnogalacturonana (RG I) da pectina. De acordo com seu modo de ação, a RGL é subdividida em:
 - i. Endo-ramnogalacturonana liase (endo-RGL) (EC 4.2.2.23): catalisa a clivagem das ligações glicosídicas α (1→4) entre os resíduos de GalpA e Rhap de forma aleatória na cadeia de RG I.
 - ii. Exo-ramnogalacturonana liase (exo-RGL) (EC 4.2.2.24): cliva as ligações glicosídicas α (1→4) entre os resíduos de GalpA e Rhap da RG I, a partir da extremidade não redutora da cadeia (WONG, 2008; RYTIOJA et al., 2014).

A Tabela 1 apresenta um resumo dos principais tipos de pectinases de acordo com a classe de enzimas ativas de carboidratos.

Tabela 1 – Classificação das pectinases a partir do banco de dados CAZy*.

Enzima	E.C.	Abreviação	Família
Protopectinase tipo A	3.2.1.-	PPase-A	GH28
Endo-poligalacturonase	3.2.1.15	Endo-PG, PG	GH28
Exo-poligalacturonase	3.2.1.67	Exo-PG, PGX	GH28

Endo-polimetilgalacturonase	3.2.1.15	Endo-PMG	GH28
Exo-polimetilgalacturonase	3.2.1.15	Exo-PMG	GH28
Ramnogalacturonana ramnohidrolase	3.2.1.174	RGRH, RGXB	GH78, -106
α -L-ramnosidase	3.2.1.40	RHA	GH78, -106
Ramnogalacturonana galacturonohidrolase	3.2.1.173	RGGH	GH28
Ramnogalacturonana hidrolase	3.2.1.171	RGH	GH28
Hidrolase de xilogalacturonana	3.2.1.-	XGH	GH28
Pectina metilesterase	3.1.1.11	PME	CE8
Pectina acetilesterase	3.1.1.6	PAE	CE12, -13, -16
Ramnogalacturonana acetilesterase	3.1.1.86	RGAE	CE12
Endo-pectato liase	4.2.2.2	Endo-PGL	PL1, -3, -9
Exo-pectato liase	4.2.2.9	Exo-PGL	PL1, -3, -9
Pectina liase	4.2.2.10	PNL, PEL	PL1
Endo-ramnoglacturonana liase	4.2.2.23	Endo-RGL	PL4, -11, -26
Exo-ramnoglacturonana liase	4.2.2.24	Exo-RGL	PL4, -11, -26

*Dados obtidos a partir do banco de dados CAZy, disponível em: (<http://www.CAZy.org/>).

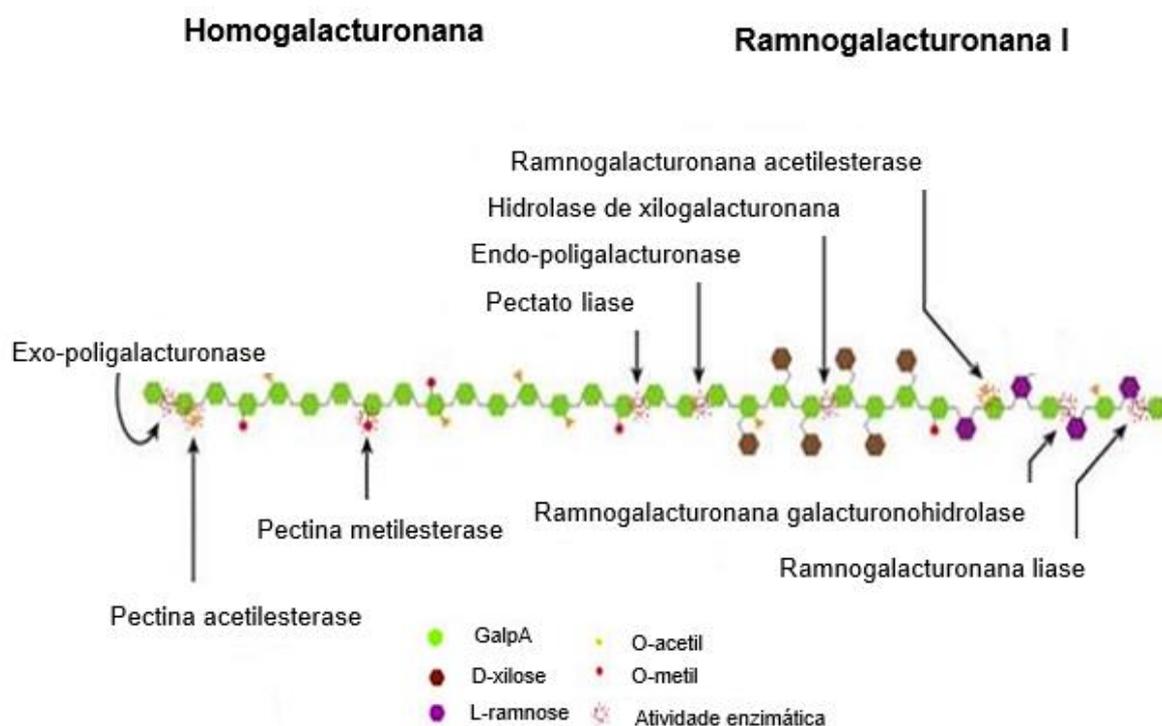


Figura 3 – Ação das principais enzimas do complexo pectinolítico sobre os domínios (Homogalacturonana e ramnogalacturonana I) da cadeia de pectina (Adaptado de GLASS et al., 2013).

3.4 Aplicação das pectinases

As pectinases ocupam uma posição de liderança entre as enzimas comercializadas no setor industrial, sendo utilizadas principalmente na extração e clarificação de sucos de frutas, em que, por meio da degradação da pectina, atuam para diminuir a viscosidade e a turbidez, possibilitando, dessa forma, a obtenção de

sucos claros e estáveis, com concentrados de alta qualidade e rendimento satisfatório, aliado à boa economia de processos (BONNIN; GARNIER; RALET, 2014; GARG et al., 2016).

Quando empregadas no vinho, as pectinases promovem a melhora na extração do suco de uva, maximizam seu rendimento, facilitam a filtração e intensificam a cor e o sabor (DOS SANTOS CAMARGO et al., 2021). A adição dessas enzimas durante o esmagamento das uvas ou no mosto de vinho melhora a extração do suco, reduzindo o tempo de clarificação e aumentando o conteúdo de terpenos no vinho (TRINDADE et al., 2016).

As enzimas pectinolíticas também têm sido utilizadas para a extração de óleos vegetais (óleo de oliva, óleo de soja, semente de abóbora e dendê), facilitando o processo e aumentando a quantidade de agentes antioxidantes e de vitamina E (UENOJO; PASTORE, 2007; TEIXEIRA et al., 2013). Já na indústria de alimentos funcionais, estas são amplamente empregadas na preparação da fibra péctica, um prebiótico ativo para a microbiota intestinal (TRINDADE et al., 2016; PING; ZHANG; GU, 2017).

Na fermentação do chá, as pectinases catalisam a hidrólise da pectina que está presente na parede celular das folhas, acelerando a fermentação. Na fermentação do café, removem a camada de mucilagem que recobre os grãos, a qual é de natureza gelatinosa e viscosa, é rica em pectina, que, ao ser removida, melhora a qualidade do produto final (AMIN, 2017; AHMED; SOHAIL, 2020).

Na produção de ração animal, as pectinases em conjunto com as xilanases e celulases são adotadas para diminuir a viscosidade da ração, aumentando a liberação e absorção de nutrientes pelos animais. O tratamento de rações com enzimas melhora a digestibilidade da ração e reduz a quantidade de fezes, melhorando o desempenho do animal (GARG et al., 2016).

Na indústria têxtil, essas enzimas são potencialmente utilizadas no tratamento das fibras naturais, com o intuito de facilitar a degomagem e tratar o resíduo líquido na biopreparação do algodão e no polimento enzimático de tecidos mistos de juta e algodão (MONTEIRO; SILVA, 2009). Já na indústria de papel, são empregadas para branquear a polpa kraft, reduzindo o impacto ambiental gerado pelos resíduos desse segmento industrial (GUO et al. 2013). Em acréscimo, as polpas tratadas com as enzimas pectinolíticas resultam em papéis mais volumosos, com maior opacidade e melhor capacidade de impressão, quando comparadas às polpas submetidas a processos químicos alcalinos (CHAUHAN; SHARMA, 2014).

Outra importante aplicação das enzimas pectinolíticas é na produção do bioetanol de segunda geração, em que são empregadas na extração dos açúcares fermentáveis (resíduos de ácido galactopiranosilurônico) a partir da pectina presente na parede celular vegetal (LATARULLO et al., 2016). Da mesma forma, o emprego de pectinases no pré-tratamento de águas residuais pécticas provenientes de indústrias de processamento de alimentos vegetais facilita a remoção do material péctico e favorece a decomposição por tratamento de iodo ativado (MAHESH et al., 2016).

Além da gama de aplicações biotecnológicas citadas, as pectinases também estão associadas à inibição da proliferação do câncer colorretal e à angiogênese das células endoteliais, podendo ser empregadas em alimentos funcionais para suprimir esse tipo de patologia (CHO et al., 2019).

3.5 Pectinases microbianas

As pectinases utilizadas na indústria são obtidas primariamente de microrganismos, das quais 50% originam-se 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). Em comparação com as enzimas de origem animal ou vegetal, as de origem microbiana apresentam muitas vantagens, incluindo: menor custo de produção, facilidade de produção em larga escala em um período curto de tempo, características físico-químicas diferentes (relacionadas ao habitat e fisiologia do microrganismo), possibilidade de manipulação genética, além de representarem um recurso renovável (ANBU et al., 2015).

Enzimas com o mesmo mecanismo de ação sob um substrato podem apresentar comportamentos diferentes de acordo com as condições às quais serão submetidas. Dessa forma, diversos fatores devem ser levados em consideração durante a produção de enzimas, a fim de se alcançar a rentabilidade e efetividade do processo, incluindo a composição do meio de cultivo, condições de temperatura e pH, tempo de incubação, aeração e fonte de carbono (PEREIRA, 2012).

Os fungos constituem um grupo bastante heterogêneo de organismos heterotróficos, eucariotos, aeróbios, aclorofilados, uni (leveduriformes) e multicelulares (filamentosos) (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996), que desempenham diversos papéis no âmbito ecológico. Assim, atuam na ciclagem de nutrientes como decompositores, fazem interações mutualistas com algas (líquens) e plantas (micorrizas), além de outras interações simbióticas, atuando como parasitas,

patógenos e predadores de animais de outros organismos (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019).

Por serem produtores de uma grande variedade de macromoléculas, os fungos filamentosos, particularmente os do gênero *Aspergillus*, são a principal fonte de enzimas utilizadas em vários processos industriais, como celulases, amilases, proteases, xilanases e pectinases (CORRÊA, 2014; McKELVEY; MURPHY, 2017). A Tabela 2 apresenta as ocorrências das pectinases em alguns fungos.

Tabela 2 – Produção de pectinases por espécies de fungos filamentosos.

Microrganismo	Enzima (abreviação)	E.C.	Referência
<i>Fusarium oxysporum</i>	Endo-PG	3.2.1.15	GARCÍA-MACEIRA et al. (2001)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	PG	3.2.1.15	THOMASSEN et al. (2011)
<i>Aspergillus awamori</i>	PG	3.2.1.15	NAGAI et al. (2000)
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40	PG	3.2.1.15	ZHANG et al. (2007)
<i>Galactomyces citri-aurantii</i> IJ-1	PG	3.2.1.15	CHO et al. (2012)
<i>Gastrophysa viridula</i>	Endo-PG	3.2.1.15	KIRSCH et al. (2014)
<i>Rhizopus oryzae</i> YM9901	Endo-PG	3.2.1.15	XIAO et al. (2008)
<i>Aspergillus niger</i> MTCC478	Exo-PG	3.2.1.67	ANAND; YADAV, S.; YADAV, D. (2017)
<i>Penicillium janczewskii</i>	Exo-PG	3.2.1.67	AMIN et al. (2020)
<i>Penicillium fellutanum</i>	Exo-PG	3.2.1.67	AMIN et al. (2021)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Exo-PG	3.2.1.67	BENAMOUN et al. (2016)
<i>Aspergillus sojae</i>	Exo-PG	3.2.1.67	HEERD; TARI; FERNÁNDEZ-LAHOURE (2014)
<i>Aspergillus niger</i>	Exo-PG	3.2.1.67	COLLA et al. (2017)
<i>Penicillium oxalicum</i> CZ1028	Endo-PG	3.2.1.15	CHENG et al. (2017)
<i>Aspergillus niger</i>	Endo-PG	3.2.1.15	WANG et al. (2017)
<i>Aspergillus sojae</i>	Endo-PG	3.2.1.15	FRATEBIANCHI; CAVELLO; CAVALITTO, (2017)
<i>Aspergillus tamaris</i>	PG/PNL	3.2.1.15 / 4.2.2.10	AMANDE et al. (2021)

A produção de pectinases por fungos filamentosos é vantajosa, visto que 90% dessas enzimas são extracelulares, facilitando a sua recuperação e purificação. Da mesma forma, o pH ótimo dessas enzimas, entre 3,0 e 6,0, é compatível com o utilizado na maioria dos processos industriais, principalmente na indústria de sucos (UENOJO; PASTORE, 2007; CHENG et al., 2017).

3.6 Gênero *Aspergillus* e *A. terreus*

Considerado o mais comum e também o mais bem estudado entre os fungos filamentosos, o gênero *Aspergillus*, reino *Fungi*, ao filo *Ascomycota*, à ordem *Eurotiales* e à família *Trichonomaceae*. As espécies que compõem este gênero são descritas como saprófitas e cosmopolitas, podendo ser isoladas do solo, água, vegetação, material em decomposição e ar (PRAKASH; JHA, 2014).

Morfologicamente, estes fungos apresentam hifas septadas, hialinas, com ramificações dicotômicas formando ângulos de 45°, em que estão presentes as estruturas de reprodução assexuada (conídios), situadas no topo de uma vesícula terminal que surge a partir do prolongamento do conidióforo. A vesícula é coberta por uma ou duas camadas de células especializadas e conídios, que são formados assexuadamente e em cadeias interconectadas. Estas células que formam os conídios são chamadas de células conidiogênicas ou fiálides, e sua conidiogênese é do tipo blástica fialídica. A fiálide pode estar inserida diretamente na vesícula (unisseriada), ou estar ligada à vesícula por meio de uma segunda camada de células (bisseriada), denominada métula (Figura 4) (GUARRO; XAVIER; SEVERO, 2010; VALENTE, 2014).

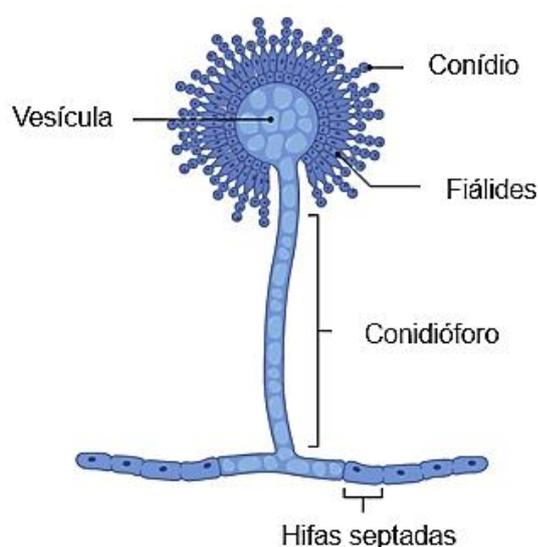


Figura 4 – Representação esquemática da morfologia do *Aspergillus* spp. (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

Descrito pela primeira vez em 1918 por Thom, o *Aspergillus terreus* caracteriza-se macroscopicamente por colônias de textura aveludada a pulverulenta, coloração castanho-canela, micélio branco e reverso marrom (Figura 5A). Microscopicamente,

os conidióforos são hialinos, de parede lisa e apresentam uma tonalidade amarelada. As cabeças conidiais são compactas, colunares e bisseriadas. Os conídios são globosos ou elipsoides, de parede lisa com coloração amarelada (Figura 5B) (MARTINS; MELO; HEINS-VACCARI, 2005; COMACLE et al., 2016). Seu genoma foi sequenciado pelo Broad Fungal Genome Initiative (estirpe NIH 2624), com tamanho estimado em 29.33 Mb, sendo codificados 10.406 genes, com 3414 genes ontologys (GOs) termos anotados. O genoma haploide dessa estirpe contém um total de 12.834 *expressed sequence tags* (EST) e está organizado em 8 cromossomos de acordo com o banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (CORRÊA, 2016).

No âmbito industrial, o *A. terreus* tem lugar de destaque na produção biotecnológica de produtos químicos de alto valor, como: produtos farmacêuticos, enzimas industriais e ácidos orgânicos, tais como o ácido itacônico (um dos monômeros ou co-monômeros de partida para a síntese química de compostos biomédicos em biorrefinarias avançadas) (KUENS et al., 2012). Da mesma forma, é amplamente utilizado na produção de lovastatina, primeiro agente da classe das estatinas usado na redução do colesterol e aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como droga contra hipercolesterolemia em 1987 (HAN et al., 2010).

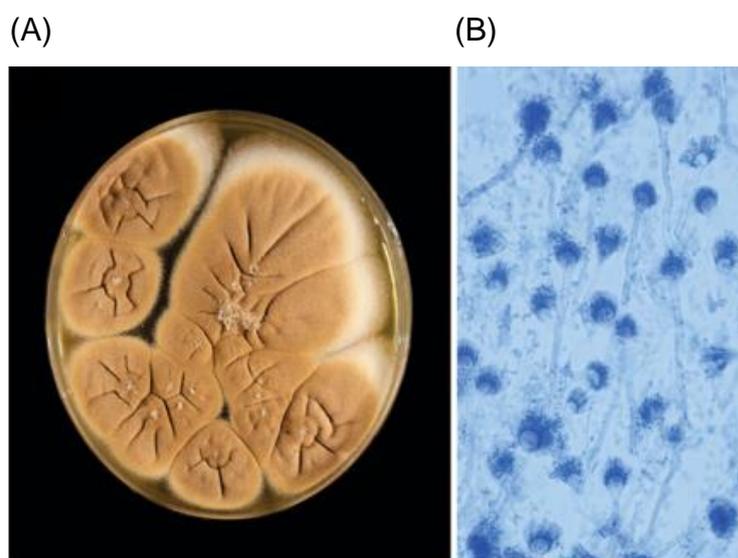


Figura 5 – Aspecto macroscópico e microscópico do *Aspergillus terreus* (COMACLE et al., 2016).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo e manutenção da linhagem de estudo

O microrganismo utilizado nesse estudo foi o *A. terreus* PA3A5T, pertencente à coleção de fungos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, isolado a partir de um fragmento de solo da Mata Atlântica localizada no município de Nova Aurora - PR (MARCOLLA et al., 2020). A manutenção rotineira da linhagem se deu por meio do cultivo em tubos estéreis contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA), incubados em estufa a 28°C por 7 dias.

4.2 Determinação da atividade enzimática e concentração de proteínas

A atividade enzimática foi determinada por meio da reação com ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959), usando a pectina cítrica 1% (0,01 g mL⁻¹) em tampão acetato de sódio 100 mmol L⁻¹ como substrato. A reação enzimática foi conduzida a 70°C por 10 minutos, seguida da leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um µmol unidade de produto formado nas condições de ensaio.

A quantificação de proteínas foi realizada segundo a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovina (BSA) como padrão. A reação se deu em temperatura ambiente, seguida da leitura a 595 nm.

4.3 Otimização das condições de cultivo

4.3.1 Efeito do meio de cultivo

Posteriormente à padronização da quantidade de esporos por contagem de conídios em Câmara de Neubauer, o cultivo do fungo foi realizado por fermentação submersa (FSm), inoculando-se 1 mL (2,4 x 10⁴ esporos/mL⁻¹) de suspensão de esporos em seis meios de cultura (*Adams, Czapek, Khanna, Klausen, SR e Vogel*) com composições distintas, suplementados com 1% de pectina cítrica e incubados em estufa do tipo B.O.D a 28°C, por 7 dias em modo estacionário. Os meios de cultivo utilizados, bem como sua composição, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Meios de cultivo testados para a produção de pectinases pelo *Aspergillus terreus* PA3A5T.

Compostos	Adams	Czapek	Khanna	Klausen	SR	Vogel
Extrato de levedura	0,2 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,45 g	-
KH ₂ PO ₄	0,1 g	0,1 g	-	-	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05 g	0,05 g	-	-	-	-
NaNO ₃	-	0,3 g	-	-	-	-
KCl	-	0,05 g	-	-	-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·7H ₂ O	-	0,001 g	-	-	-	-
CaCO ₃	-	-	-	0,1 g	-	-
Peptona	-	-	-	0,1 g	0,02 g	-
NaCl	-	-	-	0,5 g	-	-
Gelatina	-	-	-	0,25 g	-	-
Solução de sais de Khanna [20x] #	-	-	5 mL	-	-	-
Solução de sais SR [20x] *	-	-	-	-	5 mL	-
Solução de sais de Vogel [50x] ▲	-	-	-	-	-	2 mL
Solução de biotina *	-	-	-	-	-	20 µL
Água destilada q.s.p.	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Referências	ADAMS (1990)	WISEMAM (1975)	KHANNA et al. (1995)	PERALTA et al. (1990)	RIZZATTI et al. (2001)	VOGEL (1964)

#Solução de sais de Khanna [20x]: NH₄NO₃ 2 g; KH₂PO₄ 1,3 g; MgSO₄·7H₂O 0,362 g; KCl 0,098 g; ZnSO₄·H₂O 0,007 g; MnSO₄·H₂O 0,0138 g; Fe₂(SO₄)₃·6H₂O 0,0066 g; CuSO₄·5H₂O 0,0062 g; água destilada q.s.p. 100 mL.

*Solução de sais SR [20x]: MgSO₄·7H₂O 0,24 g; KH₂PO₄ 0,3 g; NH₄H₂PO₄ 1 g; água destilada q.s.p. 100 mL.

▲Solução de sais de Vogel [50x]: Na₃C₆H₅O₇·5H₂O 15 g; KH₂PO₄ 25 g; NH₄NO₃ 10 g; MgSO₄·7H₂O 1 g; CaCl₂·2H₂O 0,5 g; CHCl₃ 0,5 mL; Solução de traços de elementos* 0,5 mL; água destilada q.s.p. 100 mL;

*Solução de traços de elementos: C₆H₈O₇·H₂O 5 g; ZnSO₄·7H₂O 5 g; Fe₂(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O 1 g; CuSO₄·5H₂O 0,25 g; H₃BO₃ 0,05 g; MnSO₄·H₂O 0,05 g; Na₂MoO₄·2H₂O 0,05 g; CHCl₃ 1 mL.

*Solução de biotina: Biotina 0,05 g; Etanol 50% 100 mL.

(RASBOLD, 2020).

4.3.2 Efeito do tempo de cultivo

Para avaliação do melhor tempo de cultivo para a produção enzimática, 1 mL de suspensão de esporos foi inoculado em meio Vogel (VOGEL, 1964) contendo 1% de fonte de carbono e incubado a 28°C, em modo estacionário, durante 7 dias. Alíquotas do cultivo foram coletadas diariamente para a determinação da concentração proteica e atividade enzimática.

4.3.3 Efeito da fonte de carbono

Para determinar a melhor fonte de carbono para a produção de pectinases pelo *A. terreus* PA3A5T, ele foi inoculado em meio Vogel (VOGEL, 1964), suplementado com 1% de diferentes resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, casca de limão, casca de laranja, palha de trigo, palha de milho, casca de maracujá, palha de arroz, casca de maçã e palha de soja), a 28°C por 96 horas. A pectina cítrica (Sigma®) foi utilizada como controle positivo para a produção de pectinases.

4.3.4 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foram utilizados para avaliar a influência de três variáveis (fonte de carbono, temperatura e tempo de cultivo) sobre a atividade enzimática (U mL^{-1}), a concentração de proteínas (mg mL^{-1}) e o crescimento micelial (g) do *A. terreus* PA3A5T. Ao total, 17 ensaios foram realizados, incluindo 6 pontos axiais e 3 repetições dos pontos centrais. As respostas em função das variáveis podem ser aproximadas pela equação polinomial:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22} + \beta_{33} X_{32},$$

em que β_0 é o intercepto; β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes de primeira ordem; β_{12} , β_{13} e β_{23} são os coeficientes de interação; e β_{11} , β_{22} e β_{33} são os coeficientes de segunda ordem do modelo. As análises estatísticas foram conduzidas mediante o software Statistic 10.0, por meio da análise de ANOVA.

4.4 Extração da pectinase extracelular

Após o período de incubação, os cultivos obtidos por fermentação submersa (FSm) foram filtrados a vácuo em funil de Büchner e papel de filtro Whatman nº 1, obtendo-se um extrato livre de micélio. O extrato foi dialisado e utilizado para a determinação da atividade enzimática e concentração de proteínas, bem como para os demais experimentos.

4.5 Efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade enzimática da pectinase presente no extrato bruto

A temperatura ótima da pectinase presente no extrato bruto foi avaliada por meio da dosagem de açúcares redutores pelo método de Miller (1959), em temperaturas que variaram de 30 a 90°C. A estabilidade térmica foi determinada por meio da incubação da enzima sem substrato nas temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C, por até 120 minutos, seguida da dosagem de atividade enzimática.

A influência do pH na atividade enzimática foi verificada por meio da solubilização do substrato da reação (pectina cítrica), em tampão citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ (MCLLVAINÉ, 1921), variando o pH entre 3,0 e 9,0, seguida pela dosagem da atividade enzimática pelo método de Miller (1959). A estabilidade do pH foi avaliada por meio da incubação da enzima na ausência de substrato em mesmo tampão (MCLLVAINÉ, 1921), variando o pH entre 3,0 e 9,0, a 4°C por 24 horas. Após esse período, a atividade enzimática foi determinada por meio do método de Miller (1959).

4.6 Purificação da pectinase

4.6.1 Cromatografia de troca aniônica e exclusão molecular

O extrato enzimático extracelular dialisado foi equilibrado com tampão Tris-HCl 200 mmol L⁻¹ pH 7,2 e aplicado na coluna de troca aniônica DEAE-Sephadex (10,5 x 8,5 cm). Após a lavagem da coluna com o mesmo tampão, as proteínas foram eluídas com gradientes de NaCl (0,05–1 mol L⁻¹) e frações de 5 mL foram coletadas para a determinação da atividade enzimática e do conteúdo proteico.

As frações que apresentaram maior atividade pectinolítica foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e aplicadas na coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 HR (66,5 x 8,5 cm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 4,0. Frações de 1 mL foram coletadas para a determinação da atividade enzimática e do conteúdo de proteínas. As frações que apresentaram maior atividade enzimática foram reunidas, dialisadas e caracterizadas bioquimicamente. Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4°C.

4.7 Caracterização bioquímica da pectinase purificada

4.7.1 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

O peso molecular da enzima purificada foi determinado por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes descritas por Laemmli (1970), usando gel de empilhamento de 6% e de resolução a 10%. O marcador de peso molecular usado foi o PageRuler Plus Prestained da Thermo Scientific™, 10–250 kDa. Após a realização da eletroforese, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 e o peso molecular foi estimado com auxílio do software OriginPro 9.0.

4.7.2 Efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade enzimática

A temperatura ótima da pectinase purificada foi avaliada por meio da dosagem de açúcares redutores pelo método de Miller (1959), em temperaturas que variaram de 40 a 80°C. A estabilidade térmica foi determinada por meio da incubação da enzima sem substrato nas temperaturas de 50, 60 e 70°C, por até 120 minutos, seguida da dosagem de atividade enzimática.

A influência do pH na atividade enzimática foi verificada por meio da solubilização do substrato da reação (pectina cítrica), em tampão citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ (MCLLVAINÉ, 1921), variando o pH entre 3,0 e 9,0, seguida pela dosagem da atividade enzimática pelo método de Miller (1959). A estabilidade do pH foi avaliada por meio da incubação da enzima na ausência de substrato em mesmo tampão (MCLLVAINÉ, 1921), variando o pH entre 3,0 e 9,0, a 4°C por 24 horas. Após esse período, a atividade enzimática foi determinada por meio do método de Miller (1959).

4.7.3 Influência dos íons metálicos na atividade da pectinase

O efeito dos íons metálicos sobre a atividade da pectinase foi avaliado mediante adição de Al₂(SO₄)₃, BaCl₂, CaCl₂, CuSO₄, FeCl₂, KCl, MgCl₂, MnCl₂, NaCl, NH₄Cl, ZnSO₄ ao substrato da reação (pectina cítrica 1% em tampão acetato de sódio 100 mmol L⁻¹) nas concentrações de 1 e 10 mmol L⁻¹. O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) foi usado como controle negativo para a determinação da atividade enzimática residual (%).

4.7.4 Parâmetros cinéticos da pectinase

As equações de Michaelis-Menten foram usadas para determinar o K_m e $V_{máx}$ da enzima. O efeito da concentração do substrato na atividade da pectinase foi avaliado utilizando a pectina cítrica como substrato em várias concentrações (0 – 2,0 mg mL⁻¹). Os ensaios enzimáticos foram realizados nas condições ótimas de atividade e gráfico foi elaborado por regressão linear, utilizando o software OriginPro 9.0.

4.7.5 Especificidade do substrato

A análise de especificidade do substrato foi conduzida pela incubação da enzima com 1% (0,01 g mL⁻¹) de cada substrato (pectina cítrica, ácido poligalacturônico, amido, carboximetilcelulose [CMC], celulose microcristalina [Avicel®] e xilano de beechwood), em tampão acetato de sódio 100 mmol L⁻¹ pH 4,0, por 10 minutos a 70°C. A atividade enzimática foi determinada pelo método de Miller (1959).

4.7.6 Análise dos produtos de hidrólise

Os produtos de hidrólise foram analisados a partir da incubação da enzima purificada com o ácido poligalacturônico (0,01 g mL⁻¹ em tampão acetato de sódio 100 mmol L⁻¹ pH 4,0) a 70°C por diferentes tempos (10, 30, 60 e 1440 minutos [24 horas]). A reação foi interrompida a 100°C por 3 minutos, seguida da aplicação em cromatografia de camada delgada (TLC). A fase móvel foi constituída de n-butanol:etanol:água destilada (50:25:25) e a revelação se deu com orcinol 0,2% em solução de ácido sulfúrico:metanol (1:9) a 100°C até o aparecimento das bandas referentes aos produtos de hidrólise.

4.8 Aplicação da pectinase purificada

4.8.1 Clarificação de sucos de frutas

Para a análise de clarificação, as frutas escolhidas para a extração do suco foram a laranja Bahia (*Citrus sinensis*) e a manga tommy (*Mangifera indica* L.). Os sucos foram obtidos por meio da trituração da polpa da fruta em liquidificador com

adição de água na proporção 4:1 (fruta:água) (PAGNONCELI et al., 2019). A polpa extraída foi peneirada e, em seguida, foram adicionados $2,5 \text{ U mL}^{-1}$ de enzima por mL de suco, seguido de incubação por 4 horas a 70°C . Como controle, o mesmo volume de suco foi incubado sem adição de enzimas. Os sucos tratados foram centrifugados a 5.000 rpm por 15 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram analisados segundo os parâmetros de pH, turbidez (% T_{660nm}) e cor (A_{420nm}), usando um espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis, e comparados ao controle sem adição de enzima.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização das condições de cultivo

5.1.1 Efeito do meio de cultivo

Dos seis meios de cultivo testados, o meio Vogel foi o que apresentou maior poder de indução das enzimas do complexo pectinolítico, com $28,85 \text{ U mL}^{-1}$ de atividade enzimática, seguido do meio Khanna ($17,25 \text{ U mL}^{-1}$), Adams ($15,30 \text{ U mL}^{-1}$), SR ($14,98 \text{ U mL}^{-1}$), Czapek ($13,35 \text{ U mL}^{-1}$) e Klausen ($4,21 \text{ U mL}^{-1}$), respectivamente (Figura 6). Isso demonstra que a composição do meio de cultivo (meio complexo [Vogel] vs. meio mínimo) tem influência direta sobre o tipo e a quantidade de metabólitos produzidos durante a incubação, sugerindo que a padronização das condições de cultivo é indispensável para a obtenção de resultados significativos (HOKAK et al., 2019).

Da mesma forma, cada fungo tem uma característica morfológica e fisiológica única, capaz de justificar um comportamento distinto entre diferentes linhagens nas mesmas condições de cultivo, conforme evidenciado por Da Silva Martins et al. (2012), que, após testar os mesmos meios de cultivo para a produção de pectinase pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, obteve o maior pico de atividade enzimática ($2,0 \text{ U mL}^{-1}$) com o meio SR.

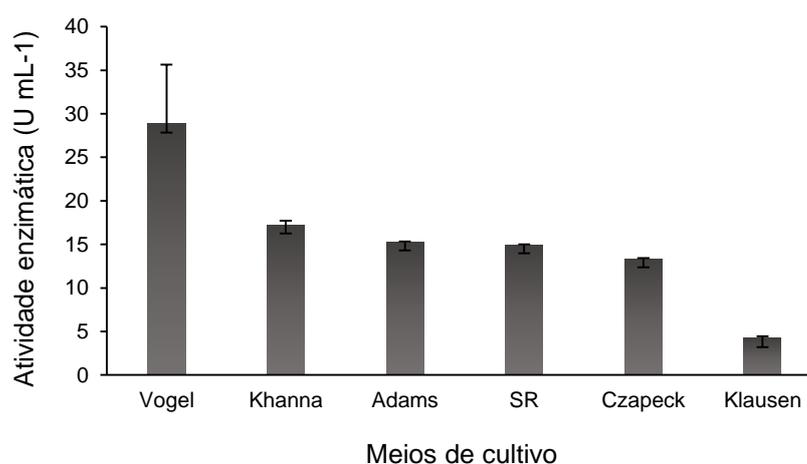


Figura 6 – Efeito do meio de cultivo sobre a atividade pectinolítica. O fungo foi cultivado em fermentação submersa (FSm) nos meios: Adams (ADAMS, 1990), Czapek (WIZEMAM, 1975), Khanna (KHANNA et al., 1995), Klusen (PERALTA et al., 1990), SR (RIZZATTI et al., 2001) e Vogel (VOGEL, 1964), suplementados com 1% de pectina cítrica (Sigma®) por 7 dias a 28°C.

5.1.2 Efeito do tempo de cultivo

A maior produção de pectinase pelo *A. terreus* PA3A5T foi observada com 96 horas de incubação (Figura 7), resultado similar à maioria dos relatos da literatura (AHMED et al., 2016; TRINDADE et al., 2016; FRATEBIANCHI et al., 2017), em que a maior produção enzimática é observada entre 96 e 144 horas.

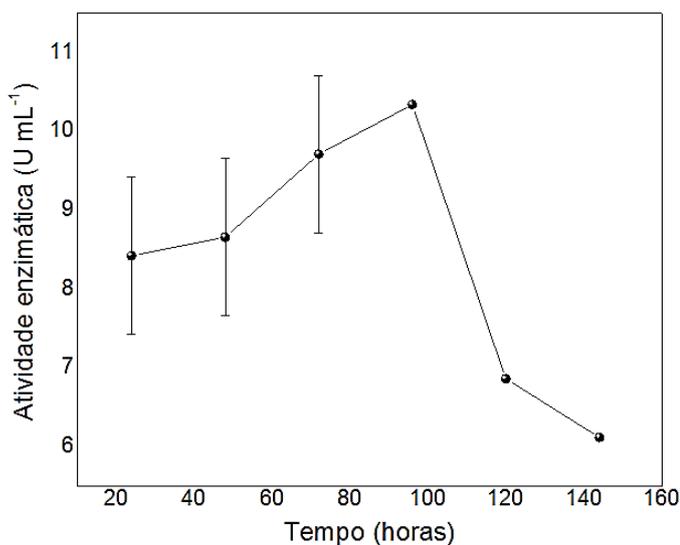


Figura 7 – Efeito do tempo de cultivo sobre a atividade da pectinase. O melhor tempo para a produção enzimática foi avaliado mediante incubação de 1 mL de suspensão de esporos em meio Vogel (VOGEL, 1964) contendo 1% de fonte de carbono, a 28°C, em modo estacionário, durante 7 dias.

A produção enzimática fúngica ocorre pela ativação da expressão gênica por meio de indutores presentes no meio de cultivo em equilíbrio com a repressão da expressão gênica por meio da repressão catabólica de carbono (CCR) (BENOCCI et al., 2017).

Para utilizar o carboidrato presente no meio, os fungos precisam reconhecer seus componentes e, posteriormente, induzir a produção de enzimas que degradarão o substrato, bem como as vias metabólicas necessárias para converter esses açúcares em energia. Tais compostos são considerados indutores, no entanto, os polissacarídeos, como a pectina, são muito grandes para entrarem na célula fúngica e, portanto, não podem atuar diretamente como indutores. Dessa forma, os fungos provavelmente reconhecem a presença de polímeros complexos por meio de compostos de baixo peso molecular (monossacarídeos e dissacarídeos) presentes no meio e desencadeiam a expressão de seus genes alvos, codificando enzimas hidrolíticas (evidenciado entre 72 e 96 horas, na Figura 7), bem como as vias metabólicas necessárias para utilizar a fonte de carbono disponível (CULLETON;

MCKIE; DE VRIES, 2013). Quando já existe monossacarídeo suficiente presente no meio, não há mais a necessidade de produzir enzimas para realizar a quebra dos polissacarídeos, e, portanto, o fator de repressão creA/CRE1 reprime a expressão dos genes que codificam essas enzimas e um declínio no gráfico é observado (evidenciado após as 100 horas de incubação, na Figura 7) (ARO; PAKULA; PENTTILÄ, 2005).

5.1.3 Efeito da fonte de carbono

O meio de cultivo (Vogel), bem como o tempo de incubação (96 horas) com melhores resultados para atividade pectinolítica, serviram de base para a análise do efeito da fonte de carbono.

A maior atividade enzimática foi observada com a casca de maracujá (16,25 U mL⁻¹), seguida da casca de maçã (15,02 U mL⁻¹), enquanto o bagaço de cana-de-açúcar (1,99 U mL⁻¹), a palha de arroz (2,50 U mL⁻¹) e o sabugo de milho (2,57 U mL⁻¹) foram as principais fontes de carbono que não estimularam a produção de pectinase (Figura 8). A maior indução enzimática pela casca de maracujá pode estar diretamente relacionada à alta concentração de pectina nesse fruto, quando comparado às demais fontes de carbono utilizadas, em que os principais componentes da parede celular são a celulose e hemicelulose em maior ou menor grau.

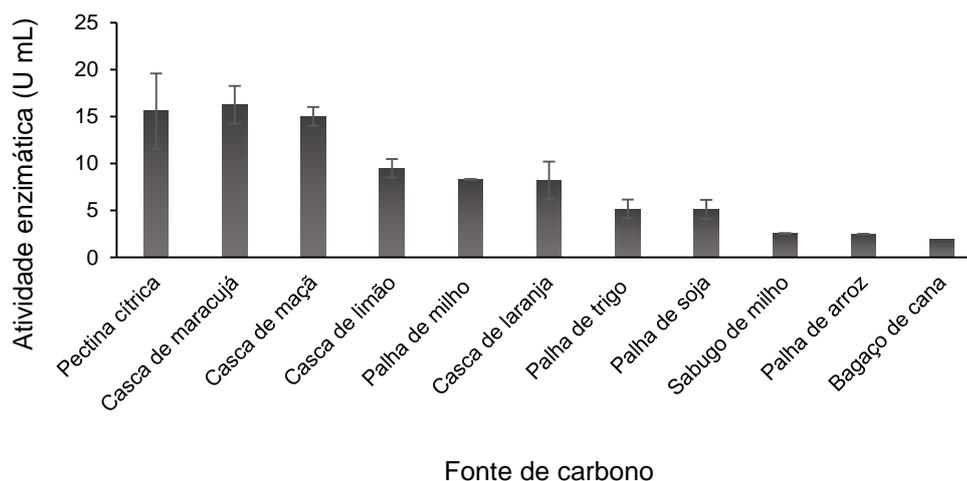


Figura 8 – Efeito da fonte de carbono sobre a atividade pectinolítica. O fungo foi inoculado em meio Vogel (VOGEL, 1964), suplementado com 1% de diferentes fontes de carbono, a 28°C por 96 horas. A pectina cítrica (Sigma®) foi utilizada como controle positivo para a produção de pectinases.

Como a fonte de carbono exerce um efeito significativo na indução da produção de enzimas, diferentes resíduos são utilizados no intuito de obter maiores titulações

de atividade enzimática. Jaramillo et al. (2015) investigaram a produção de pectinases pelo fungo *Aspergillus oryzae*, utilizando quatro fontes de carbono distintas e, assim como relatado neste estudo, obtiveram melhores resultados com a casca de maracujá. Já Amin et al. (2020) revelaram um aumento substancial na atividade enzimática para a exo-PG de *Penicillium janczewskii* na presença de glicose, pectina e manitol.

A partir dos resultados apresentados com a otimização das condições de cultivo, adotou-se como padrão de cultivo o meio Vogel, suplementado com 1% de casca de maracujá.

5.2 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

O efeito das variáveis independentes (fonte de carbono, temperatura e tempo) sobre a atividade enzimática da pectinase (U mL^{-1}) está representado na Tabela 4. A melhor condição para a produção de pectinase pelo fungo *A. terreus* PA3A5T foi encontrada no ensaio 6, em meio suplementado com 3% de fonte de carbono (casca de maracujá), a 28°C , por 120 horas.

Tabela 4 – Valores codificados e reais para as variáveis independentes (fonte de carbono, temperatura e tempo) e seu efeito na atividade enzimática da pectinase (U mL^{-1}). O fungo foi submetido a diferentes condições de cultivo com variações na concentração da fonte de carbono (1 – 3,6%), temperatura ($28 - 52^{\circ}\text{C}$) e tempo de incubação (72 – 136h).

Ensaio	Variáveis			Atividade enzimática (U mL^{-1})		
	Fonte de carbono (%)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo (h)	Valor real	Valor predito	Valor residual
1	-1 (1)	-1 (28)	-1 (72)	9,18	7,61	1,57
2	1 (3)	-1 (28)	-1 (72)	11,94	12,61	-0,67
3	-1 (1)	1 (46)	-1 (72)	4,69	7,02	-2,33
4	1 (3)	1 (46)	-1 (72)	10,93	10,17	0,75
5	-1 (1)	-1 (28)	1 (120)	14,49	14,25	0,24
6	1 (3)	-1 (28)	1 (120)	23,61	20,28	3,32
7	-1 (1)	1 (46)	1 (120)	8,97	7,30	1,66
8	1 (3)	1 (46)	1 (120)	10,93	11,50	-0,57
9	-1,68 (0,3)	0 (37)	0 (96)	7,25	7,45	-0,20
10	1,68 (3,6)	0 (37)	0 (96)	13,96	15,17	-1,21
11	0 (2)	-1,68 (21)	0 (96)	7,36	9,54	-2,18
12	0 (2)	1,68 (52)	0 (96)	2,43	1,66	0,77
13	0 (2)	0 (37)	-1,68 (55)	15,15	14,27	0,88
14	0 (2)	0 (37)	1,68 (136)	18,66	20,95	-2,29
15	0 (2)	0 (37)	0 (96)	16,31	14,13	2,18
16	0 (2)	0 (37)	0 (96)	13,64	14,13	-0,49

17	0 (2)	0 (37)	0 (96)	12,68	14,13	-1,45
----	-------	--------	--------	-------	-------	-------

A equação de regressão obtida para a atividade pectinolítica em função das variáveis independentes após análise de variância (ANOVA) pode ser representada pelo modelo codificado:

$Y \text{ (U mL}^{-1}\text{)} = 14,13 + 2,29 X_1 - 2,34 X_2 + 1,99 X_3 - 0,46 X_1X_2 + 0,25 X_1X_3 - 1,58 X_2X_3 - 0,99 X_1^2 - 3,02 X_2^2 + 1,23 X_3^2$, em que Y é a atividade enzimática (U mL⁻¹), X₁ é a fonte de carbono (%), X₂, a temperatura (°C) e X₃, o tempo (h).

De acordo com a análise de variância representada na Tabela 5, a regressão do modelo quadrático sugere que esse modelo é estatisticamente significativo e preditivo em um intervalo de confiança de 95%, uma vez que o F_{Cal.} (6,39) foi aproximadamente duas vezes maior do que o F_{Tab.} (3,68). Da mesma forma, o valor do coeficiente de determinação (R²) sugere que o modelo consegue explicar 89,15% da variabilidade dos dados experimentais e que não apresentou falta de ajuste (F_{Cal.} [2,03] < F_{Tab.} [19,30]).

Tabela 5 – Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático de segunda ordem para a atividade enzimática da pectinase (U mL⁻¹).

Fonte de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Grau de liberdade (GL)	Quadrado médio (QM)	Teste F		R ²
				F _{Calculado} (F _{Cal.})	F _{Tabelado} (F _{Tab.})	
Regressão	354,2547	9	39,361629	6,39500266	3,68	89,15654
Resíduo	43,0854	7	6,1550605			
Falta de ajuste	36,0096	5	7,2019248	2,03564961	19,3	
Erro puro	7,0758	2	3,5379			
Total	397,3401					

O gráfico do Pareto (Figura 9) demonstra as variáveis que influenciaram na atividade enzimática da pectinase. De acordo com os dados apresentados, a temperatura (linear e quadrático) influenciou de forma negativa e a fonte de carbono (linear) e o tempo de cultivo (linear), de forma positiva. Dessa forma, temperaturas elevadas diminuem a atividade enzimática e maiores concentrações de fonte de carbono, bem como um maior tempo de incubação, são capazes de aumentar a sua produção (Figura 10).

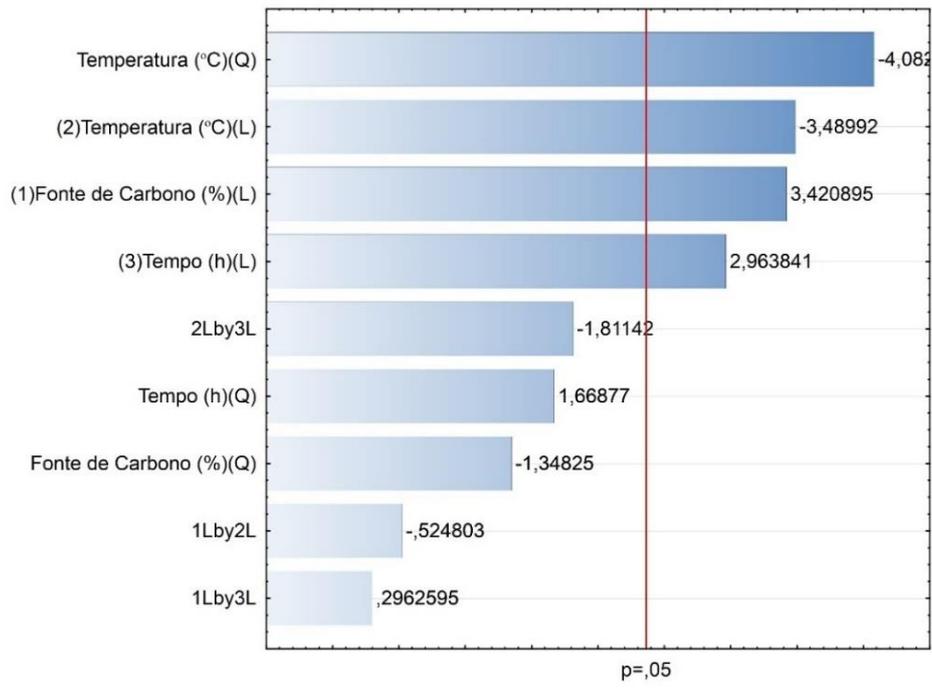
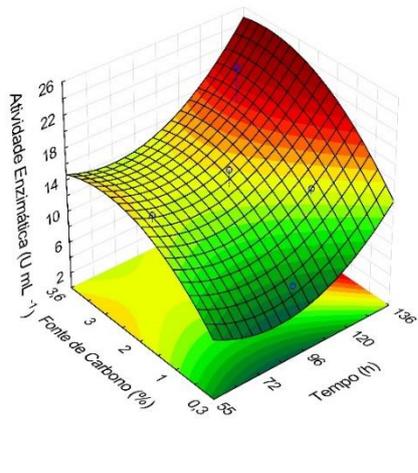
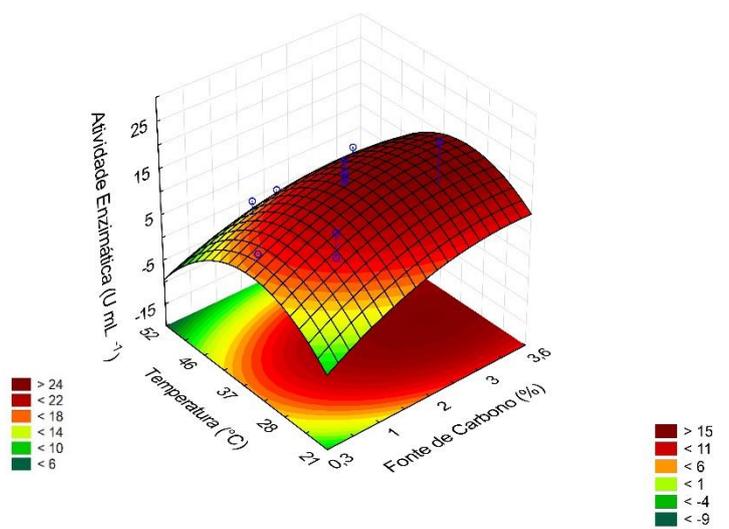


Figura 9 – Gráfico de Pareto com as variáveis que influenciaram a atividade enzimática da pectinase.

(A)



(B)



(C)

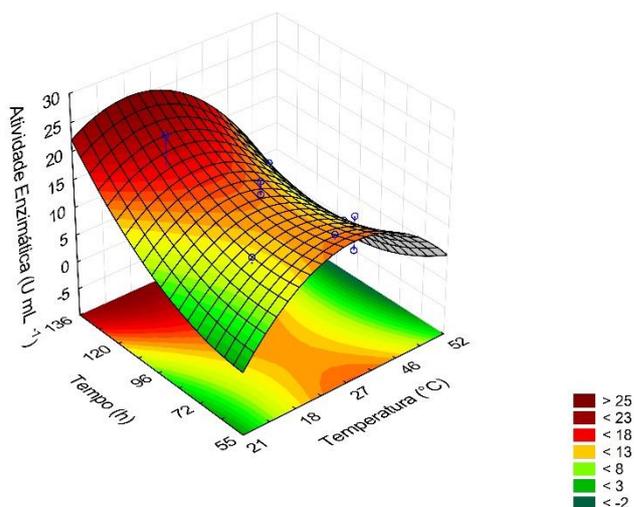


Figura 10 – Superfície de resposta para a atividade enzimática da pectinase. (A) Fonte de carbono (%) x tempo (H); (B) Temperatura (°C) x fonte de carbono (%); (C) Tempo (h) x Temperatura (°C).

Em relação à produção de proteínas (mg mL^{-1}) pelo *A. terreus* PA3A5T, as melhores condições foram observadas no ensaio 14, em meio suplementado com 2% de fonte de carbono (casca de maracujá), a 37°C, por 136 horas (Tabela 6).

Tabela 6 – Valores codificados e reais para as variáveis independentes (fonte de carbono, temperatura e tempo) e seu efeito na excreção de proteínas (mg mL^{-1}) pelo *A. terreus* PA3A5T. O fungo foi submetido a diferentes condições de cultivo com variações na concentração da fonte de carbono (1 – 3,6%), temperatura (28 – 52°C) e tempo de incubação (72 – 136h).

Ensaio	Variáveis			Proteína (mg mL^{-1})		
	Fonte de carbono (%)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Valor real	Valor predito	Valor residual
1	-1 (1)	-1 (28)	-1 (72)	0,71	0,60	0,11
2	1 (3)	-1 (28)	-1 (72)	0,93	1,02	-0,08
3	-1 (1)	1 (46)	-1 (72)	0,57	0,83	-0,26
4	1 (3)	1 (46)	-1 (72)	0,62	0,97	-0,35
5	-1 (1)	-1 (28)	1 (120)	1,27	1,33	-0,06
6	1 (3)	-1 (28)	1 (120)	1,64	1,79	-0,15
7	-1 (1)	1 (46)	1 (120)	0,57	0,90	-0,33
8	1 (3)	1 (46)	1 (120)	0,55	1,08	-0,53
9	-1,68 (0,3)	0 (37)	0 (96)	1,08	0,96	0,12
10	1,68 (3,6)	0 (37)	0 (96)	1,93	1,46	0,47
11	0 (2)	-1,68 (21)	0 (96)	0,64	0,73	-0,09
12	0 (2)	1,68 (52)	0 (96)	1,01	0,33	0,68
13	0 (2)	0 (37)	-1,68 (55)	1,41	1,26	0,15
14	0 (2)	0 (37)	1,68 (136)	2,41	1,97	0,44
15	0 (2)	0 (37)	0 (96)	2,06	1,96	0,10
16	0 (2)	0 (37)	0 (96)	1,83	1,96	-0,13

17	0 (2)	0 (37)	0 (96)	1,88	1,96	-0,08
----	-------	--------	--------	------	------	-------

A equação de regressão obtida para a produção de proteínas em função das variáveis independentes após análise de variância (ANOVA) pode ser representada pelo modelo codificado:

$$Y \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = 1,95 + 0,15 X_1 - 0,11 X_2 + 0,21 X_3 - 0,07 X_1 X_2 + 0,00 X_1 X_3 - 0,16 X_2 X_3 - 0,26 X_1^2 - 0,50 X_2^2 - 0,12 X_3^2$$

em que Y é a proteína (mg mL⁻¹), X₁ é a fonte de carbono (%), X₂, a temperatura (°C) e X₃, o tempo (h).

De acordo com os dados de ANOVA (Tabela 7), o modelo quadrático não foi significativo, uma vez que o F_{Cal.} (2,55) da regressão foi menor do que o F_{Tab.} (3,68). O valor apresentado pelo R² indica que o modelo quadrático apresentado consegue explicar 76,58% da variabilidade dos dados testados e que o modelo apresentou falta de ajuste (F_{Cal.} [22,22] > F_{Tab.} [19,30]).

Tabela 7 – Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático de segunda ordem para a excreção de proteínas (mg mL⁻¹).

Fonte de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Grau de liberdade (GL)	Quadrado médio (QM)	Teste F		R ²
				F calculado (F _{Cal.})	F tabelado (F _{Tab.})	
Regressão	5,2044	9	0,5782671	2,55784935	3,68	76,68271
Resíduo	1,5825	7	0,2260755			
Falta de ajuste	1,5533	5	0,3106524	21,2290913	19,3	
erro puro	0,0293	2	0,0146333			
Total	6,7869					

Os dados apresentados no gráfico de Pareto (Figura 11) demonstram que apenas a temperatura (quadrático) influenciou na excreção de proteínas e de forma negativa. Portanto, quanto maior a temperatura, menor será a produção de proteínas pelo *A. terreus* PA3A5T.

Quando avaliada a interação a partir das variáveis estudadas pela superfície de resposta (Figura 12), nota-se que concentrações razoáveis de fonte de carbono (2%), temperatura moderada (37°C) e maior tempo de incubação (acima de 136 horas) influenciaram diretamente no aumento da secreção de proteínas.

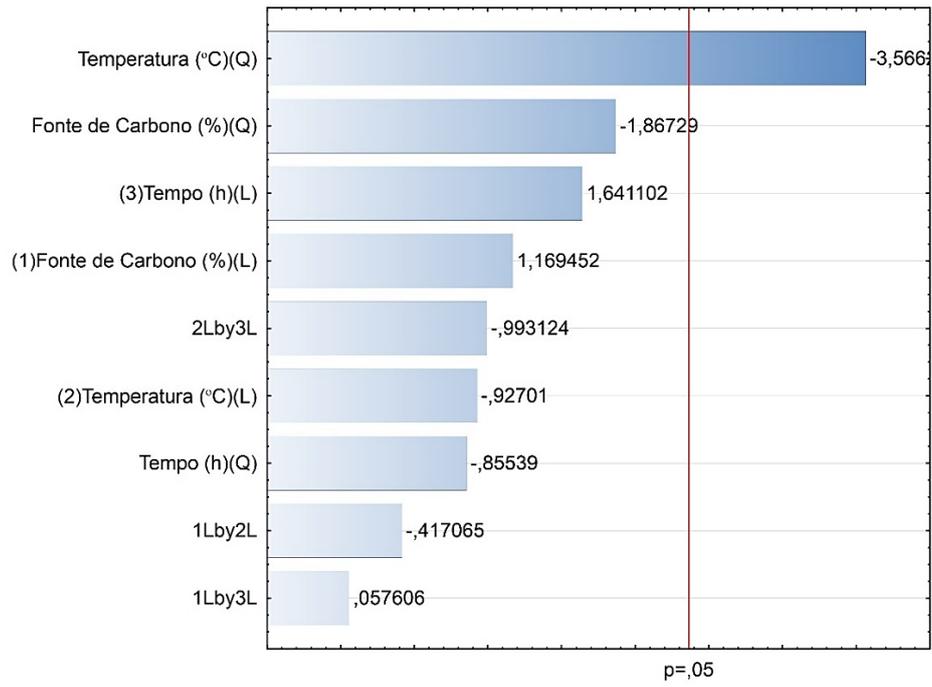
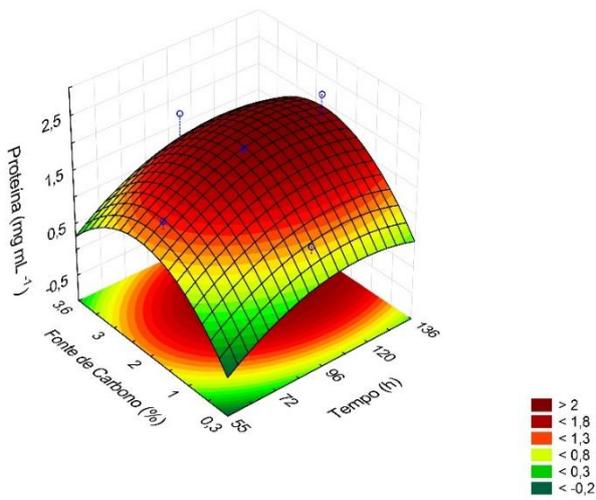
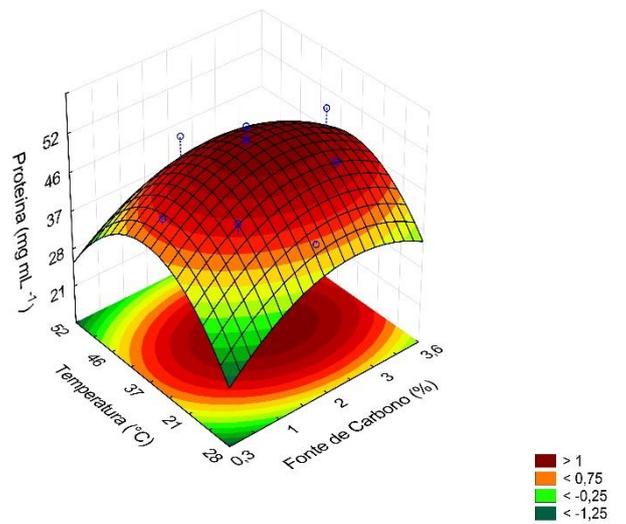


Figura 11 – Gráfico de Pareto com as variáveis que influenciaram a excreção de proteínas.

(A)



(B)



(C)

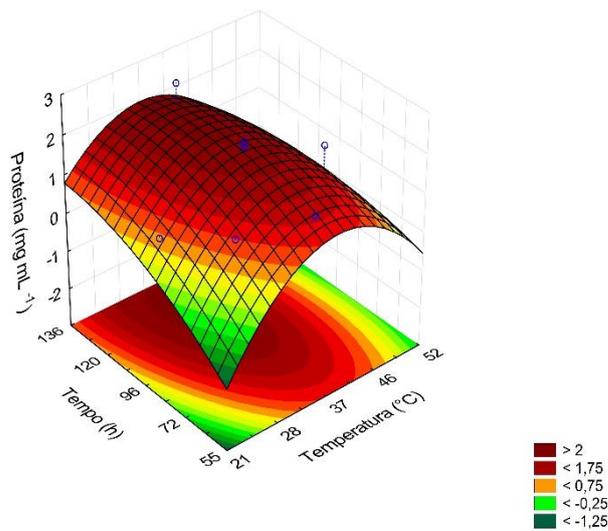


Figura 12 – Superfície de resposta para a excreção de proteínas. (A) Fonte de carbono (%) x tempo (h); (B) Temperatura (°C) x fonte de carbono (%); (C) Tempo (H) x Temperatura (°C).

Para o crescimento micelial (g), a condição mais adequada foi evidenciada no ensaio 10, em meio suplementado a 3,6% de fonte de carbono (casca de maracujá), a 37°C, por 96 horas (Tabela 8).

Tabela 8 – Valores codificados e reais para as variáveis independentes (fonte de carbono, temperatura e tempo) e seu efeito no crescimento micelial (g). O fungo foi submetido a diferentes condições de cultivo com variações na concentração da fonte de carbono (1 – 3,6%), temperatura (28 – 52°C) e tempo de incubação (72 – 136h).

Ensaio	Variáveis			Crescimento micelial (g)		
	Fonte de carbono (%)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Valor real	Valor predito	Valor residual
1	-1 (1)	-1 (28)	-1 (72)	0,09	0,10	-0,01
2	1 (3)	-1 (28)	-1 (72)	0,29	0,30	-0,01
3	-1 (1)	1 (46)	-1 (72)	0,13	0,08	0,05
4	1 (3)	1 (46)	-1 (72)	0,37	0,38	-0,01
5	-1 (1)	-1 (28)	1 (120)	0,12	0,13	-0,01
6	1 (3)	-1 (28)	1 (120)	0,24	0,31	-0,07
7	-1 (1)	1 (46)	1 (120)	0,14	0,15	-0,01
8	1 (3)	1 (46)	1 (120)	0,42	0,43	-0,01
9	-1,68 (0,3)	0 (37)	0 (96)	0,06	0,08	-0,02
10	1,68 (3,6)	0 (37)	0 (96)	0,52	0,47	0,05
11	0 (2)	-1,68 (21)	0 (96)	0,29	0,24	0,05
12	0 (2)	1,68 (52)	0 (96)	0,29	0,32	-0,02
13	0 (2)	0 (37)	-1,68 (55)	0,10	0,12	-0,02
14	0 (2)	0 (37)	1,68 (136)	0,24	0,19	0,05
15	0 (2)	0 (37)	0 (96)	0,13	0,23	-0,10

16	0 (2)	0 (37)	0 (96)	0,28	0,23	0,04
17	0 (2)	0 (37)	0 (96)	0,28	0,23	0,05

A equação de regressão obtida após a análise de variância (ANOVA) para o crescimento micelial em função das variáveis testadas pode ser predita pelo modelo codificado:

$$Y (g) = 0,23 + 0,11 X_1 + 0,02 X_2 + 0,02 X_3 + 0,02 X_1X_2 - 0,00 X_1X_3 + 0,00 X_2X_3 + 0,01 X_1^2 + 0,01 X_2^2 - 0,02 X_3^2$$

em que Y representa o crescimento micelial (g), X₁ é a fonte de carbono (%), X₂, a temperatura (°C) e X₃, o tempo (h).

A tabela ANOVA (Tabela 9) ilustra os modelos de regressão de segunda ordem para o crescimento do micélio fúngico. A regressão do modelo quadrático sugere que ele é estatisticamente significativo e preditivo em um intervalo de confiança de 95%, uma vez que o F_{Cal.} (5,43) foi maior do que o F_{Tab.} (3,68). O valor do R² sugere que o modelo consegue explicar 87,48% da variabilidade dos dados experimentais e que não apresentou falta de ajuste (F_{Cal.} [0,47] < F_{Tab.} [19,30]).

Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) do modelo quadrático de segunda ordem para o crescimento micelial (g).

Fonte de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Grau de liberdade (GL)	Quadrado médio (QM)	Teste F		R ²
				F _{Calculado} (F _{Cal.})	F _{Tabelado} (F _{Tab.})	
Regressão	0,2219	9	0,0246589	5,43625226	3,68	87,48352
Resíduo	0,0318	7	0,004536			
Falta de ajuste	0,0172	5	0,0034447	0,47419161	19,3	
Erro puro	0,0145	2	0,0072643			
Total	0,2537					

Na Figura 13, o gráfico de Pareto demonstra que apenas a fonte de carbono (linear) foi capaz de induzir o crescimento fúngico de forma significativa. Assim, quanto maior a concentração da fonte de carbono, maior será a disponibilidade de nutrientes no meio e, conseqüentemente, tende ao maior crescimento do microrganismo.

Essa afirmação se confirma por meio dos gráficos de superfície de resposta (Figura 14), em que o maior crescimento micelial é observado nos pontos axiais, com suplementação acima de 3,6%.

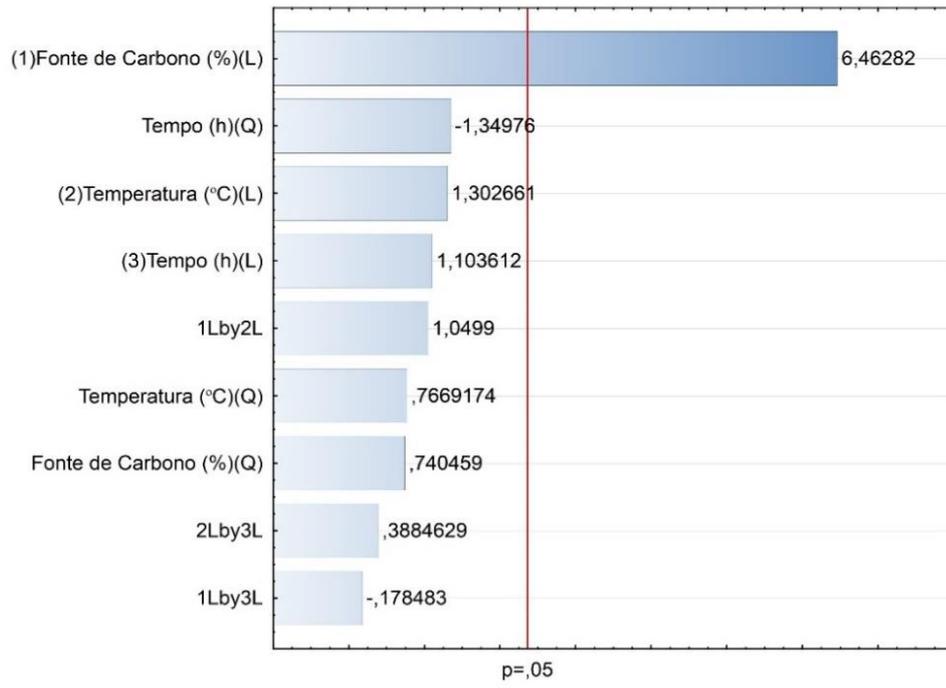
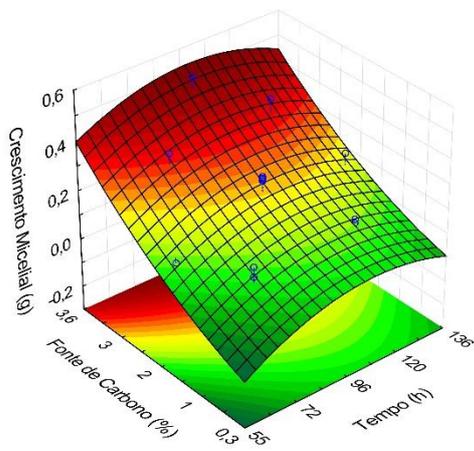
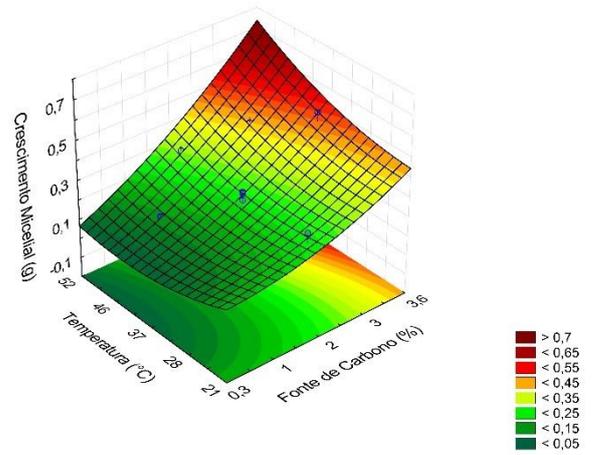


Figura 13 – Gráfico de Pareto com as variáveis que influenciaram o crescimento micelial.

(A)



(B)



(C)

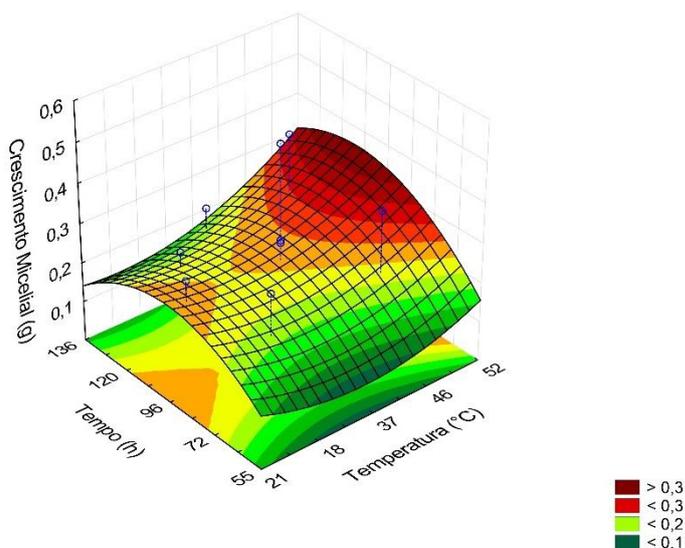


Figura 14 – Superfície de resposta para o crescimento micelial. (A) Fonte de carbono (%) x tempo (h); (B) Temperatura (°C) x fonte de carbono (%); (C) Tempo (h) x Temperatura (°C).

Após a otimização das condições de cultivo pelo DCCR, houve um aumento de 1,45 vezes na produção de pectinases ($23,61 \text{ U mL}^{-1}$) pelo *A. terreus* PA3A5T, quando comparada aos resultados anteriores à otimização ($16,15 \text{ U mL}^{-1}$), indicando que o projeto fatorial é eficaz na determinação das melhores condições de cultivo dentro de um experimento. O método de superfície de resposta (MSR) também foi empregado por Yu e Xu (2018), para otimizar as composições dos meios de cultivo para a produção de uma pectinase de *Bacillus* sp.

5.3 Efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade enzimática da pectinase presente no extrato bruto

A temperatura ótima para a pectinase presente no extrato bruto foi de 65°C (Figura 15A), superior ao observado por Martial-didier, Hubert e Parfait (2017), com temperatura ideal entre 45 e 50°C . Para os ensaios de estabilidade térmica, a pectinase manteve 100% de sua atividade durante 60 minutos a 40°C e mais de 90% até 120 minutos na mesma temperatura. Em 50°C , no entanto, a atividade enzimática caiu para aproximadamente 50% após 5 minutos de incubação, sendo totalmente inativada em 60 e 70°C (Figura 15B). Para Celestino e Filho (2005), a poligalacturonase produzida foi estável até 50°C , mantendo 75% de sua atividade máxima a 35°C , sendo completamente instável quando incubada em temperaturas acima de 70°C , durante 20 minutos.

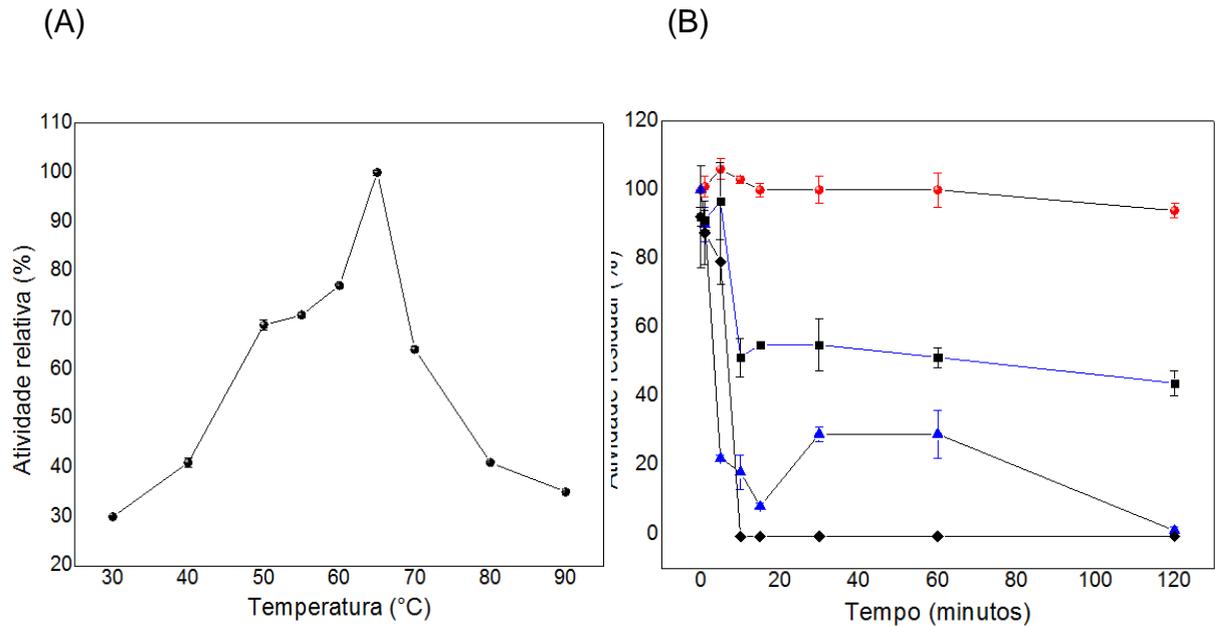


Figura 15 – Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática da pectinase presente no extrato bruto. (A) Temperatura ótima; (B) Estabilidade térmica. A temperatura ótima foi avaliada pela dosagem da atividade enzimática de 30 a 90°C. A estabilidade térmica foi determinada a partir da incubação da enzima sem substrato nas temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C, por até 120 minutos, seguida da dosagem de atividade enzimática. Símbolos: (●) 40°C, (■) 50°C, (▲) 60°C e (◆) 70°C.

Os resultados do efeito do pH na atividade enzimática revelaram que a pectinase presente no extrato bruto apresentou maior atividade em pH 6,0 (Figura 16A). Oliveira (2019), por sua vez, obteve melhores resultados em pH de 6,5, enquanto Amande et al. (2021) relataram uma faixa ótima de pH entre 3,5 e 6,0 para a produção de pectinases pelo fungo *Aspergillus tamaritii*.

Quanto à estabilidade enzimática frente ao pH, a pectinase se manteve estável em pH 5,0 e 6,0 com 100% de atividade. Em pH 7,0, mais de 80% da atividade foi mantida, e, em pH acima de 9,0, a enzima ainda se manteve estável (Figura 16B). A estabilidade apresentada está de acordo com a da PG de *Penicillium janthinellum*, relatada por Ma et al. (2016), em que a enzima foi mais estável em pH 6,0, com 90 a 100% de sua atividade total em uma ampla faixa de pH (4,0 – 8,0).

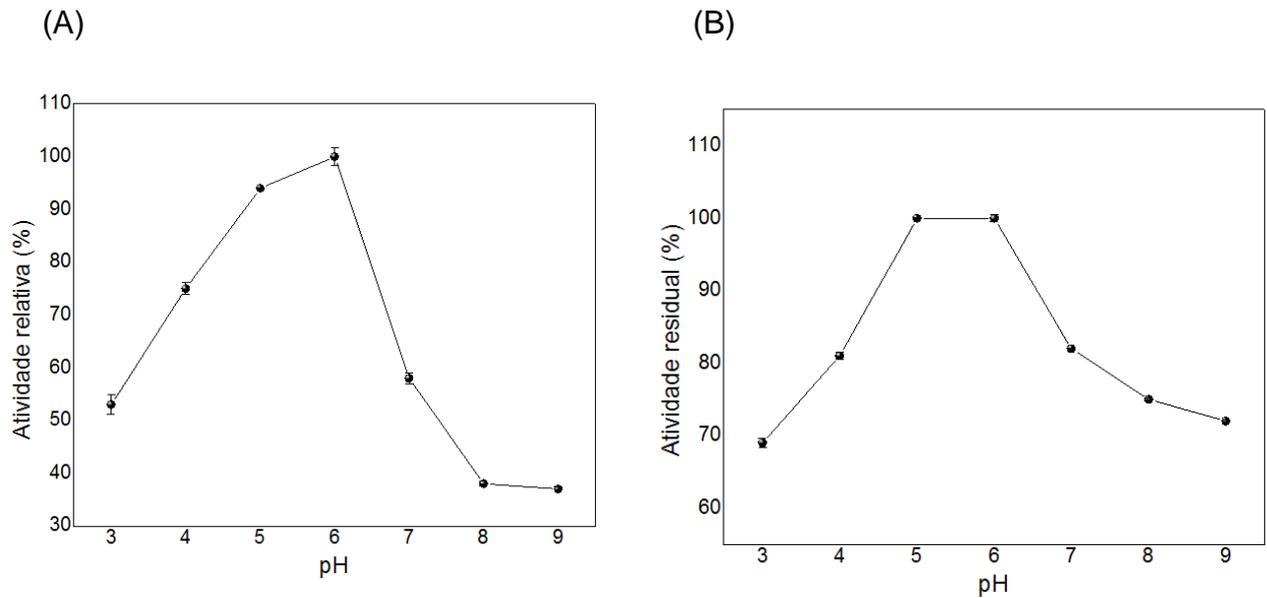


Figura 16 – Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática da pectinase presente no extrato bruto. (A) pH ótimo; (B) Estabilidade do pH. O pH ótimo foi verificado através da solubilização do substrato da reação (pectina cítrica), em tampão citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹, variando o pH entre 3,0 e 9,0, seguida pela dosagem da atividade enzimática. A estabilidade do pH foi avaliada a partir da incubação da enzima na ausência de substrato em mesmo tampão, variando o pH entre 3,0 e 9,0, a 4°C por 24 horas. Após esse período, a atividade enzimática foi determinada.

5.4 Purificação da pectinase

5.4.1 Cromatografia de troca aniônica e exclusão molecular

Após a passagem do extrato bruto dialisado na coluna DEAE-Sephadex, um pico proteico foi identificado (Figura 17A). As frações correspondentes aos picos de atividade com carga negativa foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e aplicadas na coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 HR (Figura 17B).

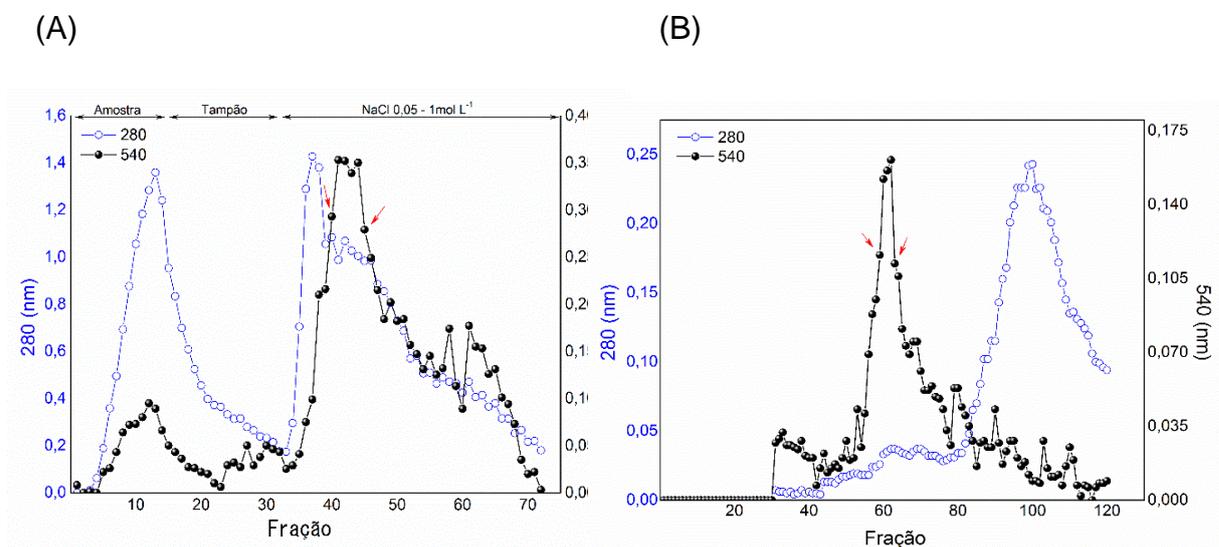


Figura 17 – Perfis cromatográficos obtidos em (A) coluna DEAE-Sephadex e (B) Sephacryl S-100 HR. O extrato enzimático extracelular dialisado foi equilibrado com tampão Tris-HCl 200 mmol L⁻¹ pH 7,2 e aplicado na coluna de troca aniônica DEAE-Sephadex. As frações que apresentaram maior atividade pectinolítica foram reunidas, dialisadas, liofilizadas e aplicadas na coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 HR, previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 4,0.

Ao final do processo de purificação, a enzima foi purificada 3,3 vezes, com recuperação de 6% e atividade específica de 49 U mg⁻¹ (Tabela 10). Em comparação com os resultados apresentados, Ázar et al. (2020) obtiveram fator de purificação de 13,3 ao final do processo, com 18,9% de recuperação para uma pectinase de *Calonectria pteridis*, valores superiores aos encontrados neste trabalho.

Tabela 10 – Etapas de purificação da pectinase.

Etapa Cromatográfica	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	Recuperação (%)	Purificação (fator)
Extrato Bruto	60	120,0	1811	15	100	1,0
DEAE - Sephadex	20	10,2	251	25	14	1,7
Sephacryl S-100 HR	10	2,2	108	49	6	3,3

A pectinase purificada foi confirmada por homogeneidade eletroforética em condições desnaturantes (SDS-PAGE), sendo possível observar uma única banda com massa relativa de aproximadamente 95,2 kDa (Figura 18A e 18B), superior ao observado por Patidar et al. (2017) para uma pectinase de *Aspergillus niger*, com massa relativa de 64,5 kDa.

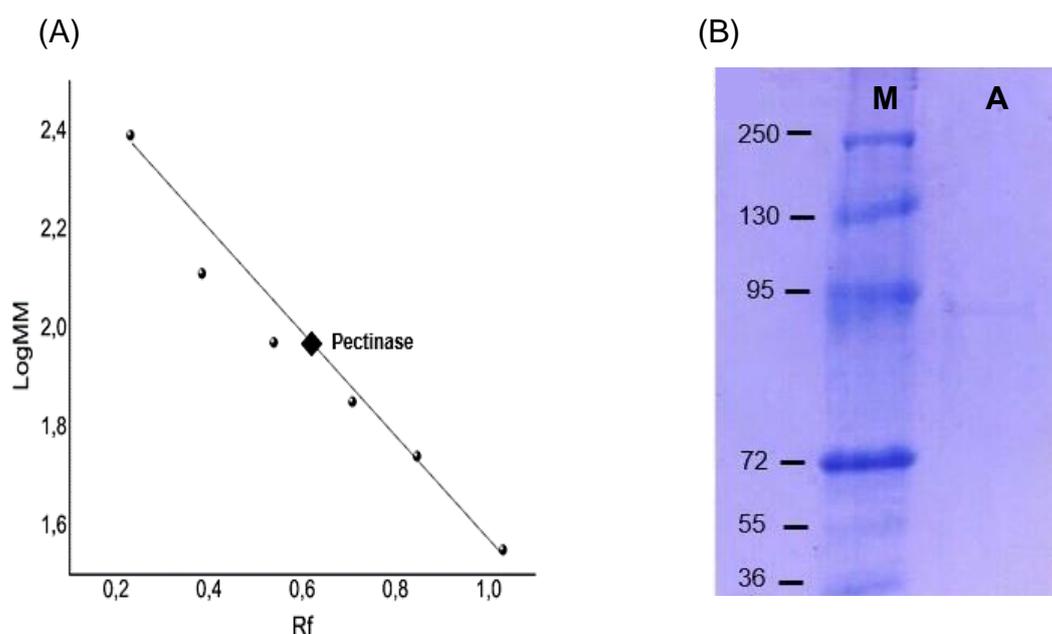


Figura 18 – (A) Massa molecular da enzima; (B) Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), com a presença de uma única banda de aproximadamente 95,2 kDa. O SDS-PAGE foi realizado em gel de empilhamento de 6% e gel de resolução de 10%, 120 V e 40 mA. O marcador de peso molecular usado foi o PageRuler Plus Prestained da Thermo Scientific™, 10–250 kDa. O gel foi

corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 e o peso molecular foi estimado usando o software OriginPro 9.0. Símbolos: (M) Marcador molecular; (A) Enzima purificada.

5.5 Caracterização bioquímica da pectinase purificada

5.5.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade enzimática

A temperatura ótima para a pectinase purificada foi de 70°C (Figura 19A), superior ao relatado para as pectinases de *Penicillium janczewskii* (45°C) (AMIN et al., 2020) e *P. fellutanum* (40°C) (AMIN et al., 2021). Com relação aos ensaios de termoestabilidade, a atividade enzimática residual se manteve acima de 70% nos primeiros 30 minutos a 50°C, sendo inativada após esse período. Em 60°C, a enzima manteve aproximadamente 80% de sua atividade em 5 minutos com redução progressiva após esse período. Em 70°C, no entanto, a pectinase manteve quase 100% de sua atividade aos 5 minutos e aproximadamente 60% durante 30 minutos, sendo desestabilizada após 60 minutos de incubação (Figura 19B). Em comparação aos resultados obtidos, KC et al. (2020) apontaram a redução de aproximadamente 50% da atividade pectinolítica em 10 minutos de aquecimento a 60°C e, em tratamento térmico adicional até 40 minutos, nenhuma atividade enzimática foi detectada.

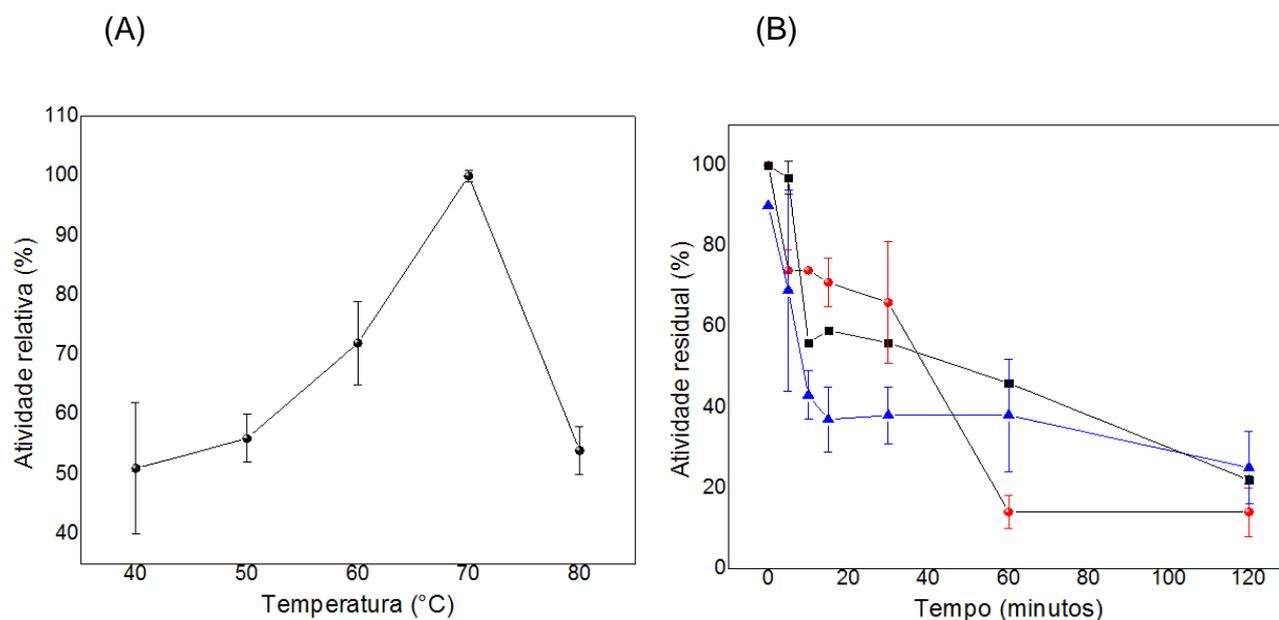


Figura 19 – Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática da pectinase purificada. (A) Temperatura ótima; (B) Estabilidade térmica. A temperatura ótima foi avaliada pela dosagem da atividade enzimática de 40 a 80°C. A estabilidade térmica foi determinada incubando a enzima sem substrato nas temperaturas de 50, 60 e 70°C por até 120 minutos, seguida da dosagem da atividade enzimática. Símbolos: (●) 50°C, (■) 60°C, (▲) 70°C.

O caráter termofílico apresentado pela pectinase é vantajoso para os processos industriais, uma vez que é possível obter uma maior atividade específica, diminuindo a quantidade de enzimas empregadas no processo; é possível armazenar a enzima em condições ambientais com consequente redução de custos de refrigeração; além de oferecer uma redução significativa dos riscos de contaminação microbiana, devido à possibilidade de operar em temperaturas mais elevadas (BHALLA et al., 2013; VIIKARI et al., 2007).

Os resultados obtidos nos ensaios de pH sobre a atividade enzimática revelaram que a enzima apresentou maior atividade em pH 4,0 (Figura 20A). Pectinases ácidas também foram descritas por Pagarra, Rahman e Manas (2019) (pH de 3,0 – 7,0), Shanmugavel et al. (2018) (pH 4,0) e Martins et al. (2013) (pH 4,5 e 5,5).

Em relação aos estudos de estabilidade do pH, a pectinase foi estável em pH 4,0 e manteve mais de 80% de sua atividade em pH 5,0, sendo que, acima do pH 6,0, pouca atividade foi detectada (Figura 20B). Okonji et al. (2019) obtiveram resultados similares para a pectinase de *A. fumigatus*, em que a enzima se manteve estável em pH 5,0 e teve sua atividade reduzida significativamente em outras faixas de pH.

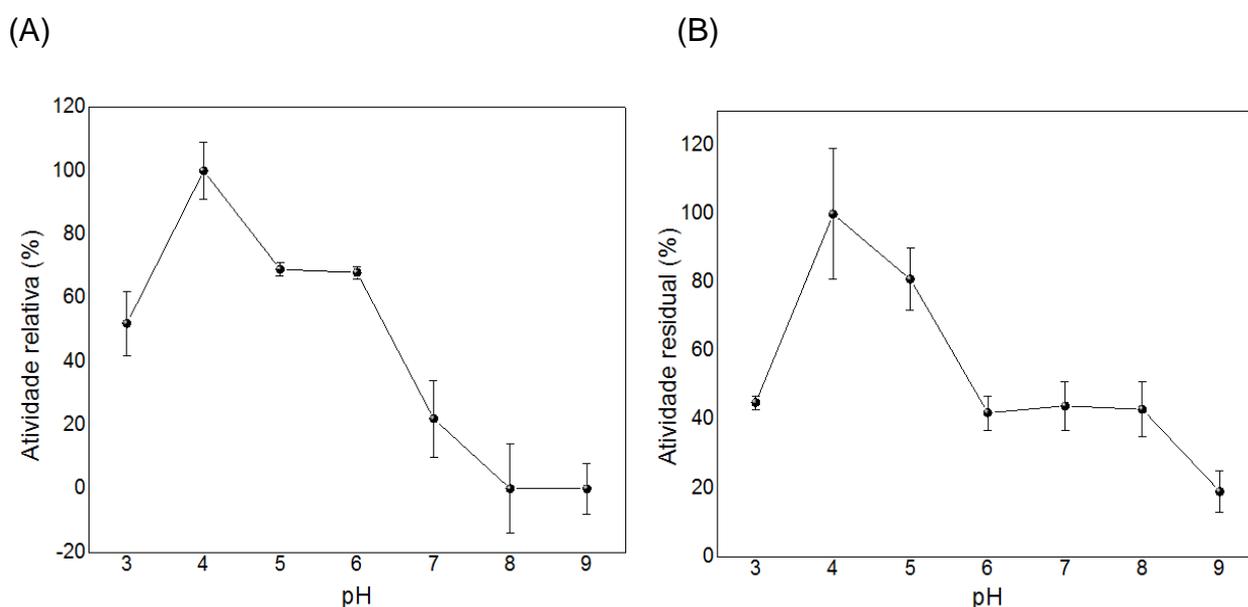


Figura 20 – Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática da pectinase purificada. (A) pH ótimo; (B) Estabilidade do pH. O pH ótimo foi verificado por meio da solubilização do substrato em tampão citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹, variando o pH entre 3,0 e 9,0, seguido da dosagem da atividade enzimática. A estabilidade em pH foi avaliada incubando a enzima na ausência do substrato no mesmo tampão e pH, a 4°C, por 24 horas. Após esse período, a atividade enzimática foi determinada.

5.5.2 Influência dos íons metálicos na atividade da pectinase

O efeito dos íons metálicos nas concentrações de 1 e 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade da pectinase está representado na Tabela 11. Na concentração de 1 mmol L⁻¹, os íons FeCl₂, SnCl₂, CoCl₂, ZnSO₄, NaCl, Al₂(SO₄)₃, MgCl₂ e MnCl₂ aumentaram a atividade enzimática em aproximadamente 168, 88, 85, 54, 23, 15 e 9%, respectivamente. Já a 10 mmol L⁻¹, a ativação enzimática foi verificada na presença dos íons FeCl₂, MgCl₂, Al₂(SO₄)₃ e CuSO₄, com um aumento de aproximadamente 116, 112, 50 e 43%, respectivamente, e completa inativação na presença de KCl, NH₄Cl, CaCl₂, BaCl₂ e PbCl₂.

Tabela 11 – Efeito dos íons metálicos nas concentrações de 1 e 10 mmol L⁻¹ sobre a atividade da pectinase*.

Íons	Atividade relativa (%)					
	1 mmol L ⁻¹			10 mmol L ⁻¹		
EDTA (controle negativo)	100,0	±	0,12	100,0	±	0,14
FeCl ₂	267,6	±	1,23	216,3	±	0,17
SnCl ₂	188,2	±	0,78	0,00	±	0,14
CoCl ₂	185,3	±	1,94	0,00	±	0,50
ZnSO ₄	154,5	±	0,42	72,1	±	0,74
NaCl	122,7	±	0,52	0,00	±	0,15
Al ₂ (SO ₄) ₃	115,5	±	1,11	149,6	±	1,08
MgCl ₂	111,7	±	0,19	212,3	±	0,34
MnCl ₂	108,8	±	1,23	0,00	±	0,23
CuSO ₄	98,7	±	1,06	142,9	±	0,39
KCl	85,2	±	0,76	0,00	±	0,20
NH ₄ Cl	84,2	±	0,34	0,00	±	0,19
CaCl ₂	80,9	±	0,44	0,00	±	0,46
BaCl ₂	74,1	±	0,35	0,00	±	0,46
PbCl ₂	0,0	±	0,15	0,00	±	0,30

*Os valores representam a média e erro padrão (±) de três dosagens independentes.

A ativação enzimática na presença desses íons se deve principalmente às mudanças na conformação e na estabilização do sítio catalítico da enzima, ou pela ação de alguns cátions diretamente sobre substrato, alterando suas propriedades e aumentando a afinidade da enzima pelo mesmo (LOPINA, 2016). A ativação enzimática pelos íons MgCl₂ e FeCl₂ também foi relatada para as pectinases de *A. niger* (KHATRI et al., 2015; AJAYI et al., 2021) e *Bacillus subtilis* (JOSHI; NERURKAR; ADIVAREKAR, 2015; OUMER; ABATE, 2017).

A completa inibição pelo íon $PbCl_2$ descrita neste trabalho também foi observada para uma pectinase ácida no estudo de Nazir et al. (2019) e ocorre principalmente pela formação de complexos agente inibitório/enzima que geram a modificação de aminoácidos fundamentais para a atividade catalítica (LOPINA, 2016).

5.5.3 Parâmetros cinéticos da pectinase

O valor da constante de Michaelis (K_m) para a degradação da pectina cítrica pela enzima purificada foi de $1,83 \text{ mg mL}^{-1}$, próximo ao relatado para pectinase de *Aspergillus niger* ($K_m = 1,6 \text{ mg mL}^{-1}$) (DALAGNOL et al., 2017) e *Penicillium janthinellum* ($K_m = 1,74 \text{ mg mL}^{-1}$) (MA et al., 2016). Porém, quando comparamos ao K_m relatado para as pectinases de *Aspergillus aculeatus* ($K_m = 11,49 \text{ mg mL}^{-1}$) (MOHAMMADI et al., 2019); ($K_m = 9,09 \text{ mg mL}^{-1}$) (MOHAMMADI et al., 2020), podemos afirmar que o valor encontrado nesse estudo foi mais satisfatório, uma vez que, quanto menor o K_m , maior será a afinidade da enzima pelo substrato e menor será a concentração de substrato necessária para que ela atinja a sua velocidade máxima para uma reação de primeira ordem.

A velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) encontrada foi de 335 U mg^{-1} , semelhante ao relatado para *Bacillus halodurans* ($V_{m\acute{a}x} = 351 \text{ U mg}^{-1}$) (MEI et al., 2013), no entanto, superior ao observado para *Achaetomium* sp. ($V_{m\acute{a}x} = 98 \text{ U mg}^{-1}$) (CHENG et al., 2017) e *Penicillium chrysogenum* ($V_{m\acute{a}x} = 85 \text{ U mg}^{-1}$) (BANU et al., 2010).

5.5.4 Especificidade ao substrato

A análise de especificidade ao substrato demonstrou que a pectinase foi capaz de atuar sobre diferentes compostos (Tabela 12), com maior atividade catalítica sobre o ácido poligalacturônico, seguido de pectina cítrica, celulose microcristalina e amido. Esse caráter bifuncional foi observado para as pectinases de *Hylocereus polyrhizus* (AMID; ZOHDI, 2014) e *Penicillium janthinellum* (PAGNONCELI et al., 2019), enquanto, para *Bacillus subtilis*, a atividade enzimática foi observada apenas com a pectina cítrica (OUMER; ABATE, 2017). A ausência de atividade para o xilano de beechwood e CMC também foi relatada por Cheng et al. (2017) para a pectinase de *Penicillium oxalicum*. Uma vez que a maior atividade foi observada com o substrato ácido poligalacturônico, a enzima foi classificada como uma poligalacturonase.

Tabela 12 – Especificidade ao substrato para a pectinase purificada de *Aspergillus terreus* PA3A5T. A enzima foi incubada com 1% (0,01 g mL⁻¹) de cada substrato em tampão acetato de sódio 100 mmol L⁻¹ pH 4,0, por 10 minutos, a 70°C*.

Substrato	Ligação principal	Atividade relativa (%)
Ácido poligalacturônico	α-1,4	100
Pectina cítrica	α-1,4	49
Celulose microcristalina	β-1,4	31
Amido	α-1,4/ α-1,6	26
Xilano de beechwood	β-1,4	ND**
CMC	β-1,4	ND**

*Os valores representam a média e erro padrão (±) de três dosagens independentes. O ácido poligalacturônico foi usado como controle (100%) para os cálculos de atividade relativa, pois apresentou maior atividade enzimática.

** ND = Não detectado.

5.5.5 Análise dos produtos de hidrólise

A análise dos produtos de hidrólise por cromatografia em camada delgada (TLC) demonstrou que a hidrólise máxima do ácido poligalacturônico ocorreu com 24 horas de incubação, com liberação única de monogalacturonato como produto da reação (Figura 21).

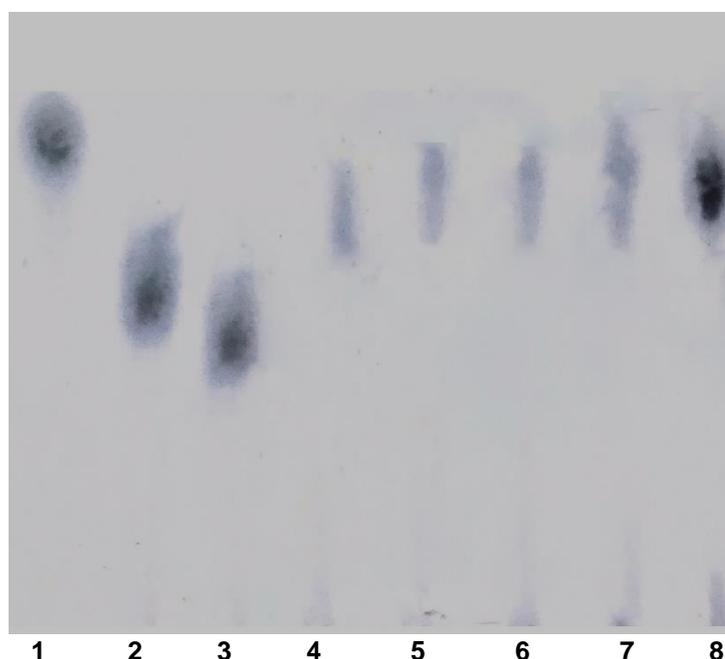


Figura 21 – Cromatografia em camada delgada (TLC) da enzima purificada de *Aspergillus terreus* PA3A5T. (1) Ácido monogalacturônico (1 mg mL⁻¹); (2) Ácido digalacturônico (1 mg mL⁻¹); (3) Ácido trigalacturônico (1 mg mL⁻¹); (4) Ácido poligalacturônico a 1%; (5), (6), (7) e (8) Reação incubada por 10, 30, 60 e 1440 minutos (24 horas), respectivamente. Os produtos da hidrólise foram analisados incubando a enzima com ácido poligalacturônico (0,01 g mL⁻¹) em tampão de acetato de sódio (100 mmol L⁻¹; pH 4,0) a 70°C por diferentes períodos de tempo, seguido de aplicação em CCD. A fase

móvel consistiu de n-butanol: etanol: água destilada (50:25:25) e a revelação se deu com orcinol 0,2% em ácido sulfúrico: solução de metanol (1:9) a 100°C.

O comportamento enzimático apresentado sugere que a pectinase do *A. terreus* PA3A5T apresenta mecanismo de ação na extremidade terminal da cadeia do ácido poligalacturônico, caracterizando-a como uma exo-poligalacturonase (EC 3.2.1.67). O mesmo perfil foi observado para as pectinases de *A. niger* (ANAND; YADAV, S.; YADAV, D., 2017) e *P. occitanis* (TOUNSI et al., 2016).

5.6 Aplicação da pectinase purificada

5.6.1 Clarificação de sucos de frutas

O efeito da pectinase purificada na clarificação dos sucos de laranja e manga está evidenciado na Tabela 13. A clareza é expressa em transmitância (%T₆₆₀) e, quanto maior a % observada, menor será a turbidez do suco. Da mesma forma, quanto maior a redução da cor, maior será a % da absorbância (%A₄₂₀).

Tabela 13 – Efeito da pectinase purificada na clarificação dos sucos de laranja e manga segundo os parâmetros de pH, turbidez e cor*.

Suco	pH inicial	pH pós-tratamento	%T ₆₆₀	%A ₄₂₀
Laranja Bahia	4,5	4,5	44	48
Manga tommy	4,4	4,4	22	52

*Dados em relação ao controle sem adição de enzimas.

A transmitância percentual aumentou 44 e 22%, com redução da cor de 48 e 52% para o suco de laranja e manga, respectivamente. O resultado apresentado indica que a pectinase agiu de forma efetiva em ambos os sucos, com redução significativa da viscosidade, principalmente para o suco de laranja. Outro ponto de destaque é a redução da cor acima de 50% para o suco de manga, valor superior à maioria dos trabalhos relatados na literatura (Figura 22).

Isso sugere que a pectinase extraída do *Aspergillus terreus* PA3A5T pode ser amplamente empregada no processo de clarificação de sucos pelo seu alto poder de hidrólise das substâncias pécticas e também por apresentar alta atividade catalítica na faixa de pH (4,0) da maioria dos sucos de frutas (pH ácido). O uso de pectinases no tratamento dos sucos de frutas tem sido relatado por muitos pesquisadores em variados tipos de frutas, como o caju (ABDULLAH et al., 2021), a romã (CERRRETI

et al., 2017), o mamão (TU et al., 2013), a palma (MOHANTY et al., 2018), o jamun (GHOSH; PRADHAN; MISHRA, 2017) e a maçã (KEMPKA; PRESTES; ALVIERO, 2013).

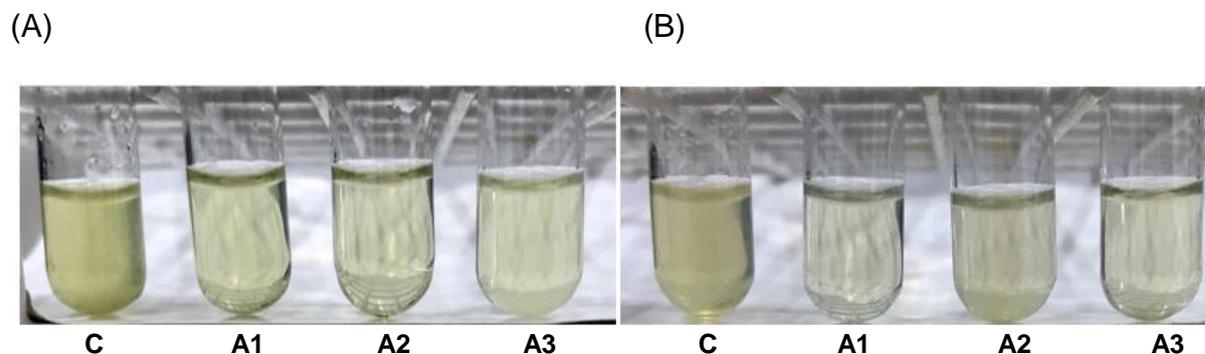


Figura 22 – Clarificação de (A) suco de laranja e de (B) manga. (C) Controle; (A1), (A2) e (A3) Amostras tratadas com pectinase purificada. Os sucos foram obtidos a partir da trituração da polpa da fruta no liquidificador com adição de água na proporção de 4: 1 (fruta: água). A polpa extraída foi peneirada e, em seguida, foram adicionados $2,5 \text{ U mL}^{-1}$ de enzima por mL de suco, seguido de incubação a 70°C por 4 horas. O controle foi o suco incubado sem enzimas. Os sucos tratados foram centrifugados a 5.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C , e os parâmetros de pH, turbidez (% T660nm) e cor (A420nm) foram avaliados.

6 CONCLUSÕES

A exo-poligalacturonase (EC 3.2.1.67) do *Aspergillus terreus* PA3A5T se mostrou muito eficaz na clarificação dos sucos de laranja e manga, reduzindo consideravelmente a viscosidade e a cor. Em acréscimo, por apresentar um caráter termofílico e alta atividade em pH ácido, a enzima estudada pode ser amplamente empregada nos processos industriais, com destaque para a clarificação dos sucos de frutas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio deste estudo, foi possível evidenciar a capacidade de produção de uma exo-poligalacturonase pelo *A. terreus* PA3A5T, bem como elucidar o mecanismo de ação dessa enzima na clarificação de sucos de frutas. Dessa forma, a exo-PG de *A. terreus* se mostra como uma alternativa eficaz na substituição dos processos químicos tradicionais para a clarificação de sucos de frutas, permitindo a obtenção de sucos mais claros e de maior valor agregado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, S.; PRADHAN, R. C.; PRADHAN, D.; MISHRA, S. Modeling and optimization of pectinase-assisted low-temperature extraction of cashew apple juice using artificial neural network coupled with genetic algorithm. **Food Chemistry**, v. 339, p. 127862, 2021.

ADAMS, P. R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopatologia**, v. 112, n. 1, p. 35-37, 1990.

AHMED, J.; THAKUR, A.; GOYAL, A. Emerging trends on the role of recombinant pectinolytic enzymes in industries-An overview. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 38, p. 102200, 2021.

AHMED, I.; ZIA, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AKRAM, Z.; NAVEED, M. T.; NOWROUZI, A. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, p. 148-154, 2016.

AHMED, A.; SOHAIL, M. Characterization of pectinase from *Geotrichum candidum* AA15 and its potential application in orange juice clarification. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 1, p. 955-961, 2020.

AJAYI, A. A.; LAWAL, B.; SALUBI, A. E.; ONIBOKUN, A. E.; ONIHA, M. I.; AJAYI, O. M. Pectinase Production by *Aspergillus niger* using Pineapple Peel Pectin and Its Application in Coconut Oil Extraction. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 655, n. 1, p. 012014, 2021.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.

AMANDE, T.; ADEBAYO-TAYO, B.; NDUBUISI-NNAJI, U.; ADO, B. Production and partial characterization of pectinases from mango peels by *Aspergillus tamarii*. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2021, p. 59-62, 2021.

AMID, M.; MANAP, Y.; ZOHDI, K. Purification and characterisation of thermo-alkaline pectinase enzyme from *Hylocereus polyrhizus*. **European Food Research and Technology**, v. 239, n. 1, p. 21-29, 2014.

AMIN, F.; AROOJ, T.; NAZLI, Z. I. H.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Exo-polygalacturonase production from agro-waste by *Penicillium fellutanum* and insight into thermodynamic, kinetic, and fruit juice clarification. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-11, 2021.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M.; ASGHER, M. Improvement of activity, thermostability and fruit juice clarification characteristics of fungal exo-polygalacturonase. **International journal of biological macromolecules**, v. 95, p. 974-984, 2017.

AMIN, F.; MOHSIN, A.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Production, thermodynamic characterization, and fruit juice quality improvement characteristics of an Exo-polygalacturonase from *Penicillium janczewskii*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1868, n. 5, p. 140379, 2020.

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. 1-8, 2017.

ANBU, P.; GOPINATH, S. C. B.; CHAULAGAIN, B. P.; TANG, T. H.; CITARTAN, M. Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2014. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 816419, 2015.

ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILÄ, M. Regulação transcricional da degradação da parede celular vegetal por fungos filamentosos. **Revisões de microbiologia FEMS**, v. 29, n. 4, p. 719-739, 2005.

ATMODJO, M. A.; HAO, Z.; MOHNEN, D. Evolving Views of Pectin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 28.1-28.33, 2013.

AVCI, U.; PEÑA, M. J.; O'NEILL, M. A. Changes in the abundance of cell wall apiogalacturonan and xylogalacturonan and conservation of rhamnogalacturonan II structure during the diversification of the Lemnoideae. **Planta**, v. 247, n. 4, p. 953-971, 2018.

ÁZAR, R. I. L.; DA LUZ MORALES, M.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; FALKOSKI, D. L.; ALFENAS, R. F.; GUIMARÃES, V. M. Apple juice clarification by a purified polygalacturonase from *Calonectria pteridis*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 119, p. 238-245, 2020.

BANU, A. R.; DEVI, M. K.; GNANAPRABHAL, G. R.; PRADEEP, B. V.; PALANISWAMY, M. Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 377-381, 2010.

BENAMOUN, L.; HILIGSMANN, S.; DAKHMOUCHE, S.; AIT-KAKI, A.; LABBANI, F. Z. K.; NOUADRI, T.; THONART, P. Production and Properties of a Thermostable, pH—Stable Exo-Polygalacturonase Using *Aureobasidium pullulans* Isolated from Saharan Soil of Algeria Grown on Tomato Pomace. **Foods**, v. 5, n. 4, p. 72, 2016.

BENOCCI, T.; AGUILAR-PONTES, M. V.; ZHOU, M.; SEIBOTH, B.; DE VRIES, R. P. Regulators of plant biomass degradation in ascomycetous fungi. **Biotechnology for biofuels**, v. 10, n.1, p. 1-25, 2017.

BHALLA, A.; BANSAL, N.; KUMAR, S.; BISCHOFF, K. M.; SANI, R. K. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. **Bioresource technology**, v. 128, p. 751-759, 2013.

BIZ, A.; FARIAS, F. C.; MOTTER, F. A.; DE PAULA, D. H.; RICHARD, P.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. 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.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

CELESTINO, S. M. C.; FERREIRA FILHO, E. X. Caracterização de pectinases de *Acrophialophora nainiana* e *Trichoderma harzianum* linhagem T6. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 97-104, 2005.

CERRETI, M.; LIBURDI, K.; BENUCCI, I.; SPINELLI, S. E.; LOMBARDELLI, C.; ESTI, M. Optimization of pectinase and protease clarification treatment of pomegranate juice. **LWT-Food Science and Technology**, v. 82, p. 58-65, 2017.

CHAUHAN, S.; SHARMA, A. K. Enzyme treatment in improving the quality of pseudo stem fiber of banana plant to use this bioresource for making handmade paper. **International Journal of Fiber and Textile Research**, v. 4, n. 3, p. 57-61, 2014.

CHAVEZ-SANTOSCOY, A.; BENAVIDES, J.; VERMAAS, W.; RITO-PALOMARES, M. Application of aqueous two-phase systems for the potential extractive fermentation of cyanobacterial products. **Chemical Engineering and Technology**, v. 33, n. 1, p. 177-182, 2010.

CHENG, Z.; CHEN, D.; LU, B.; WEI, Y.; XIAN, L.; LI, Y.; LUO, Z.; HUANG, R. A Novel Acid-Stable Endo-Polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028: Purification, Characterization, and Application in the Beverage Industry. **J Microbiol Biotechnol**, v. 26, n. 6, p. 989-998, 2017.

CHO, H. D.; KIM, J. H.; WON, Y. S.; MOON, K. D.; SEO, K. I. Inhibitory Effects of Pectinase-Treated Prunus Mume Fruit Concentrate on Colorectal Cancer Proliferation and Angiogenesis of Endothelial Cells. **Journal of food science**, v. 84, n. 11, p. 3284-3295, 2019.

CHO, I. J.; YEO, I. C.; LEE, N. K.; JUNG, S. H.; HAHM, Y. T. Heterologous expression of polygalacturonase genes isolated from *Galactomyces citri-aurantii* IJ-1 in *Pichia pastoris*. **The Journal of Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 332-340, 2012.

COENEN, G. J.; BAKX, E. J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. **Carbohydrate polymers**, v. 70, n. 2, p. 224-235, 2007.

COLLA, E.; SANTOS, L. O.; DEAMICI, K.; MAGAGNIN, G.; VENDRUSCOLO, M.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of amyloglucosidase and exo-polygalacturonase by *Aspergillus niger* in a rotating drum reactor. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 181, n. 2, p. 627-637, 2017.

COMACLE, P.; GOVIC, Y. L.; HOCHÉ-DELCHET, C.; SANDRINI, J.; AGUILAR, C.; BOUYER, B.; BLANCHI, S.; PENN, P. Spondylodiscitis due to *Aspergillus terreus* in

an immunocompetent host: case report and literature review. **Mycopathologia**, v. 181, n. 7-8, p. 575-581, 2016.

CORRÊA, J. M.; MINGORI, M. R.; GANDRA, R. F.; LOTH, E. A.; SEIXAS, F. A.; SIMÃO, R. C. Depletion of the xynB2 Gene Upregulates β -Xylosidase Expression in *C. crescentus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 2, p. 1085-1097, 2014.

CORRÊA, C. L. **Estudo do transcrito global do fungo *Aspergillus terreus* quando cultivado em resíduos agroindustriais**. 2016. 152 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

CULLETON, H.; MCKIE, V.; DE VRIES, R. P. Aspectos fisiológicos e moleculares da degradação de polissacarídeos vegetais por fungos: o que aprendemos com *Aspergillus*?. **Jornal de biotecnologia**, v. 8, n. 8, p. 884-894, 2013.

DA COSTA, R. Parede Celular Vegetal. **Revista de Ciência Elementar**, v. 7, n. 1, 2019.

DA SILVA MARTINS, E.; LEITE, R. S. R.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production and characterization of polygalacturonase from thermophilic *Thermoascus aurantiacus* on submerged fermentation. **Annals of microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1199-1205, 2012.

DALAGNOL, L. M.; SILVEIRA, V. C.; DA SILVA, H. B.; MANFROI, V.; RODRIGUES, R. C. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. **Process Biochemistry**, v. 61, p. 80-87, 2017.

DING, J.; ZHOU, Y.; ZHU, H.; DENG, M.; LONG, L.; YANG, Y.; WU, Q.; HUANG, Z. Identification and characterization of an acetyl esterase from *Paenibacillus* sp. XW-6-66 and its novel function in 7-aminocephalosporanic acid deacetylation. **Biotechnology letters**, v. 41, n. 8, p. 1059-1065, 2019.

DOS SANTOS CAMARGO, G.; ALMEIDA, J.; SANCHES, A. C. C.; MALLER, A. Ação das enzimas celulase, invertase, pectinase e xilanase na produção de vinhos—uma revisão sistemática da literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 5, p. 19296-19317, 2021.

FRATEBIANCHI, D.; CRESPO, J. M.; TARI, C.; CAVALITTO, S. Control of agitation rate and aeration for enhanced polygalacturonase production in submerged fermentation by *Aspergillus sojae* using agro-industrial wastes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 92, p. 305-310, 2017.

GARCÍA-MACEIRA, F. I.; DI PIETRO, A.; HUERTAS-GONZÁLEZ, M. D.; RUIZ-ROLDÁN, M. C.; RONCERO, M. I. G. Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during early stages of infection. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2191-2196, 2001.

GHOSH, P.; PRADHAN, R. C.; MISHRA, S. Low-temperature extraction of Jamun juice (Indian Black Berry) and optimization of enzymatic clarification using Box-Behnken design. **Journal of Food Process Engineering**, v. 40, n. 2, p. e12414, 2017.

GLASS, N. L.; SCHMOLL, M.; CATE, J. H.; CORADETTI, S. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Annual review of microbiology**, n. 67, p. 477-498, 2013.

GUARRO, J.; XAVIER, M. O.; SEVERO, L. C. Differences and similarities amongst pathogenic *Aspergillus* species. In: *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Springer Netherlands, p. 7-32, 2010.

GUO, F.; ZOU, M.; LI, X.; ZHAO, J.; QU, Y. An effective degumming enzyme from *Bacillus* sp. Y1 and synergistic action of hydrogen peroxide and protease on enzymatic degumming of ramie fibers. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

HAN, M. J.; KIM, N. J.; SANG, Y. L.; HO, N. C. Extracellular proteome of *Aspergillus terreus* grown on different carbon sources. **Curr Genet**, v. 56, p. 369-382, 2010.

HEERD, D.; TARI, C.; FERNÁNDEZ-LAHORE, M. Microbial strain improvement for enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus sojae*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7471-7481, 2014.

HORAK, I.; ENGELBRECHT, G.; VAN RENSBURG, P. J.; CLAASSENS, S. Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides. **Journal of applied microbiology**, v. 127, n. 2, p. 326-343, 2019.

JARAMILLO, P. M. D.; ANDREAUS, J.; NETO, G. P. D. S.; CASTRO, C. F. D. S.; FILHO, E. X. F. The characterization of a pectin-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae* grown on passion fruit peel as the carbon source and the evaluation of its potential for industrial applications. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 33, n. 5-6, p. 310-322, 2015.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2931-2944, 2005.

JOSHI, M.; NERURKAR, M., ADIVAREKAR, R. Characterization, kinetic, and thermodynamic studies of marine pectinase from *Bacillus subtilis*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 45, p. 205-220, 2015.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 215-227, 2001.

KC, S.; UPADHYAYA, J.; JOSHI, D. R.; LEKHAK, B.; KUMAR CHAUDHARY, D.; RAJ PANT, B.; BAJGAI, T. R.; DHITAL, R.; KHANAL, S.; KOIRALA, N.; RAGHAVAN, V. Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. **Fermentation**, v. 6, n. 2, p. 59, 2020.

KEMPKA, A. P.; PRESTES, R. C.; ALVIERO, T. Clarificação de suco de maçã de dois cultivares utilizando tratamento enzimático e colágeno hidrolisado. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 15, n. 2, p. 137-146, 2013.

KHANNA, P. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 242-243, 1995.

KHATRI, B. P.; BHATTARAI, T.; SHRESTHA, S.; MAHARJAN, J. Alkaline thermostable pectinase enzyme from *Aspergillus niger* strain MCAS2 isolated from Manaslu Conservation Area, Gorkha, Nepal. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2015.

KIRSCH, R.; GRAMZOW, L.; THEIßEN, G.; SIEGFRIED, B. D.; HECKEL, D. G.; PAUCHET, Y. Horizontal gene transfer and functional diversification of plant cell wall degrading polygalacturonases: key events in the evolution of herbivory in beetles. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 52, p. 33-50, 2014.

KUENZ, A.; GALLENMULLER, Y.; WILLKE, T.; VORLOP, K. D. Microbial production of itaconic acid: developing a stable platform for high product concentrations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1209-1216, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LATARULLO, M. B.; TAVARES, E. Q.; PADILLA, G.; LEITE, D. C.; BUCKERIDGE, M. S. Pectins, endopolygalacturonases, and bioenergy. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1401, 2016.

LOMBARD, V.; GOLACONDA RAMULU, H.; DRULA, E.; COUTINHO, P. M.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. **Nucleic acids research**, v. 42, n. D1, p. D490-D495, 2014.

LOPINA, O. D. **Enzyme Inhibitors and Activators**. In: Enzyme Inhibitors and Activators, Murat Senturk, IntechOpen, 2016.

MA, Y.; SUN, S.; HAO, H.; XU, C. Production, purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Penicillium janthinellum* sw09. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, p. 479-487, 2016.

MAHESH, M.; ARIVIZHIVENDHAN, K. V.; MAHARAJA, P.; BOOPATHY, R.; HAMSAVATHANI, V.; SEKARAN, G. Production, purification and immobilization of pectinase from *Aspergillus ibericus* onto functionalized nanoporous activated carbon (FNAC) and its application on treatment of pectin containing wastewater. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 43-54, 2016.

MARCOLLA, A. C.; RASBOLD, L.; DA SILVA, G. C.; KADOWAKI, M. K.; DA CONCEIÇÃO SILVA, J. L.; SIMÃO, R. D. C. G.; MALLER, A. Screening of filamentous fungi from the Atlantic Forest biome producing enzymes of the pectinolytic complex. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 57580-57585, 2020.

MARQUEZ, L. A.; PÁRAMO, M. G. Z.; ROMERO, E. L.; CAMACHO, H. C. Biotechnological potential of pectinolytic complexes of fungi. **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 859-868, 2011.

MARTIAL-DIDIER, A. K.; HUBERT, K. K.; PARFAIT, K. E. J. Partial purification and Characterization of Two Pectinases (Polygalacturonase and Pectin lyase) from Papaya Pericarp (*Carica papaya* cv. solo 8). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 6, p. 2729-2739, 2017.

MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T.; HEINS-VACCARI, E. M. **Atlas de Microbiologia Média**. Copyright, Editora Manole Ltda, 2005. p. 39-45.

McKELVEY, S. M.; MURPHY, R. A. Biotechnological Use of Fungal Enzymes. *In*: KAVANAGH, K. (Ed.). **Fungi: Biology and Applications**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2017. p. 201-225.

MCLLVAIN, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, p. 183-186, 1921.

MEI, Y.; CHEN, Y.; ZHAI, R.; LIU, Y. Cloning, purification and biochemical properties of a thermostable pectinase from *Bacillus halodurans* M29. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 94, p. 77-81, 2013.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOHAMMADI, M.; HESHMATI, M. K.; SARABANDI, K.; FATHI, M.; LIM, L. T.; HAMISHEHKAR, H. Activated alginate-montmorillonite beads as an efficient carrier for pectinase immobilization. **International journal of biological macromolecules**, v. 137, p. 253-260, 2019.

MOHAMMADI, M.; MOKARRAM, R. R.; SHAHVALIZADEH, R.; SARABANDI, K.; LIM, L. T.; HAMISHEHKAR, H. Immobilization and stabilization of pectinase on an activated montmorillonite support and its application in pineapple juice clarification. **Food Bioscience**, v. 36, p. 100625, 2020.

MOHANTY, S.; MISHRA, S.; PRADHAN, R. C. Optimisation of enzymatic extraction and characterization of palm (*Borassus flabellifer*) juice. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 12, n. 4, p. 2644-2656, 2018.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3., n. 5, p. 9-23, 2009.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología médica**. Elsevier Health Sciences, 2017.

NAGAI, M.; OZAWA, A.; KATSURAGI, T.; KAWASAKI, H.; SAKAI, T. Cloning and heterologous expression of gene encoding a polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 64, n. 8, p. 1580-1587, 2000.

NAKAMURA, A.; FURUTA, H.; MAEDA, H.; TAKAO, T.; NAGAMATSU, Y. Analysis of the molecular construction of xylogalacturonan isolated from soluble soybean polysaccharides. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 5, p. 1155-1158, 2002.

NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. **Biological Reviews**, v. 94, p. 1443-1476, 2019.

NAZIR, Z.; IJAZ, S.; GUL, R.; SALEEM, M. Purification and characterization of an acidic polygalacturonase from grapes and its potential to improve juice quality. **Pak. J. Zool**, v. 51, p. 1387-1402, 2019.

OKONJI, R. E.; ITAKORODE, B. O.; OVUMEDIA, J. O.; ADEDEJI, O. S. Purification and biochemical characterization of pectinase produced by *Aspergillus fumigatus* isolated from soil of decomposing plant materials. **J App Biotech**, v. 7, n. 3, p. 1-8, 2019.

OLIVEIRA, L. F. R. **Caracterização parcial de holocelulases e pectinases de isolado fúngico anemofílico cultivado em resíduos agrícolas**. 2019.

OUMER, O. J.; ABATE, D. Characterization of pectinase from *Bacillus subtilis* strain Btk 27 and its potential application in removal of mucilage from coffee beans. **Enzyme research**, v. 2017, 2017.

PAGARRA, H.; RAHMAN, R. A.; MANAS, N. H. A. Screening of factors influencing exo-polygalacturonase production by *Aspergillus niger* ATCC 120120 using two-level fractional factorial design. **Jurnal Teknologi**, v. 81, n. 6, 2019.

PAGNONCELI, J.; RASBOLD, L. M.; ROCHA, G. B.; SILVA, J. L. C.; KADOWAKI, M. K.; SIMÃO, R. D. C. G.; MALLER, A. Biotechnological potential of an exo-polygalacturonase of the new strain *Penicillium janthinellum* VI2R3M: biochemical characterization and clarification of fruit juices. **Journal of applied microbiology**, v. 127, n. 6, p. 1706-1715, 2019.

PATIDAR, M. K.; NIGHOJKAR, A.; NIGHOJKAR, S.; KUMAR, A. Purification and characterization of polygalacturonase produced by *Aspergillus niger* AN07 in Solid State Fermentation. **Canadian Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 11, 2017.

PERALTA, R. M.; TEREZI, H. F.; JORGE, J. A. β -D-glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1033, n. 3, p. 243-249, 1990.

PEREIRA, V. M. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulasas por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer**. 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PRAKASH, R.; JHA, S. N. Basics of the genus *Aspergillus*. **International Journal of Research in Botany**, v. 4, n. 2, p. 26-30, 2014.

RAJULAPATI, V.; GOYAL, A. Molecular cloning, expression and characterization of pectin methylesterase (CtPME) from *Clostridium thermocellum*. **Molecular biotechnology**, v. 59, n. 4-5, p. 128, 2017.

RASBOLD, L. M. **β -frutofuranosidase de *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM: purificação, caracterização bioquímica e aplicação na produção de açúcar invertido**. 2020. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2020.

REHM, B. H.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. A New Metabolic Link between Fatty

Acid de NovoSynthesis and Polyhydroxyalkanoic Acid Synthesis: the phag gene from *Pseudomonas putidakt* 2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme a transferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 37, p. 24044-24051, 1998.

RIZZATTI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase 47 produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 156-160, 2001.

ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A. **Práticas de micologia veterinária**. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. Micologia Veterinária. Prática 8. Seropédica, 2002.

RYTIOJA, J.; HILDÉN, K.; YUZON, J.; HATAKKA, A.; DE VRIES, R. P.; MÄKELÄ, M. R. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 614-649, 2014.

SHANMUGAVEL, M.; VASANTHARAJ, S.; YAZHMOZHI, A.; BHAVSAR, P.; ASWIN, P.; FELSHIA, C.; MANI, U.; RANGANATHAN, B.; GNANAMANI, A. A study on pectinases from *Aspergillus tamarii*: Toward greener approach for cotton bioscouring and phytopigments processing. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 295-303, 2018.

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.

SHI, H.; DING, H.; HUANG, Y.; WANG, L.; ZHANG, Y.; LI, X.; WANG, F. Expression and characterization of a GH43 endo-arabinanase from *Thermotoga thermarum*. **BMC biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2014.

TEIXEIRA, C. B.; MACEDO, G. A.; MACEDO, J. A.; DA SILVA, L. H. M.; RODRIGUES, A. M. D. C. Simultaneous extraction of oil and antioxidant compounds from oil palm fruit (*Elaeis guineensis*) by an aqueous enzymatic process. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 575-581, 2013.

THOMASSEN, L. V.; LARSEN, D. M.; MIKKELSEN, J. D.; MEYER, A. S. Definition and characterization of enzymes for maximal biocatalytic solubilization of prebiotic polysaccharides from potato pulp. **Enzyme and microbial technology**, v. 49, n. 3, p. 289-297, 2011.

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. 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. V.; DESAGIACOMO, C.; POLIZELI, M. D. L. T. D. M.; DAMASIO, A. R. D. L.; LIMA, A. M. F.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. 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.

TU, T.; MENG, K.; BAI, Y.; SHI, P.; LUO, H.; WANG, Y.; YANG, P.; ZHANG, Y.; ZHANG, W.; YAO, B. High-yield production of a low-temperature-active polygalacturonase for papaya juice clarification. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2974-2981, 2013.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

VALENTE, J. **Estudo molecular de estirpes de *Aspergillus fumigatus* isolados em aviários e em aves diagnosticadas com aspergilose**. Possíveis implicações na Saúde Pública. 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2014.

VIIKARI, L.; ALAPURANEN, M.; PURANEN, T.; VEHEMAANPERÄ, J.; SIIKA-AHO, M. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. **Biofuels**, p. 121-145, 2007.

VOGEL, H. F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. **The American Naturalist**, v. 98, p. 435-446, 1964.

WANG, J.; ZHANG, Y.; QIN, X.; GAO, L.; HAN, B.; ZHANG, D.; ZHANG, W. Efficient expression of an acidic endo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* and its application in juice production. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 13, p. 2730-2736, 2017.

WILLATS, W. G.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.

WISEMAN, A. **Handbook of Enzyme Biotechnology**. 1. ed. Chichester: Ellis Horwood, 1975.

WONG, D. Enzymatic deconstruction of backbone structures of the ramified regions in pectins. **The protein journal**, v. 27, n. 1, p. 30-42, 2008.

WU, P.; YANG, S.; ZHAN, Z.; ZHANG, G. Origins and features of pectate lyases and their applications in industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-14, 2020.

XIAO, C.; BARNES, W. J.; ZAMIL, M. S.; YI, H.; PURI, V. M.; ANDERSON, C. T. Activation tagging of Arabidopsis POLYGALACTURONASE INVOLVED IN EXPANSION2 promotes hypocotyl elongation, leaf expansion, stem lignification, mechanical stiffening, and lodging. **The Plant Journal**, v. 89, n. 6, p. 1159-1173, 2016.

XIAO, Z.; WANG, S.; BERGERON, H.; ZHANG, J.; LAU, P. C. A flax-retting endopolygalacturonase-encoding gene from *Rhizopus oryzae*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 4, p. 563-571, 2008.

YU, P.; XU, C. Production optimization, purification and characterization of a heat-tolerant acidic pectinase from *Bacillus* sp. ZJ1407. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 972-980, 2018.

YU, P.; ZHANG, Y.; GU, D. Production optimization of a heat-tolerant alkaline pectinase from *Bacillus subtilis* ZGL14 and its purification and characterization. **Bioengineered**, v. 8, n. 5, p. 613-623, 2017.

ZHANG, J.; ZHAO, L.; GAO, B.; WEI, W.; WANG, H.; XIE, J. Protopectinase production by *Paenibacillus polymyxa* Z6 and its application in pectin extraction from apple pomace. **Journal of food processing and preservation**, v. 42, n. 1, p. e13367, 2018.

ZHANG, Y. L.; ZHAO, Q. X.; ZHU, H.; SUN, J.; HAN, F. M.; YUAN, S. Expression of endopolygalacturonase A of *Aspergillus oryzae* in *Escherichia coli*. **Sheng wu gong cheng xue bao= Chinese journal of biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 101-105, 2007.