

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

NELCIELE CAVALIERI DE ALENCAR GUIMARÃES

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA  
DE PECTINASES DE *Aspergillus japonicus* E *Thermoascus aurantiacus*:  
APLICAÇÃO DA ENZIMA DE *A. japonicus* NA CLARIFICAÇÃO DE  
SUCOS DE FRUTAS**

**CAMPO GRANDE - MS**

**MARÇO - 2023**

**NELCIELE CAVALIERI DE ALENCAR GUIMARÃES**

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA  
DE PECTINASES DE *Aspergillus japonicus* E *Thermoascus aurantiacus*:  
APLICAÇÃO DA ENZIMA DE *A. japonicus* NA CLARIFICAÇÃO DE  
SUCOS DE FRUTAS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora.

**Orientadora:** Profa. Dra. Giovana Cristina Giannesi

CAMPO GRANDE - MS

MARÇO - 2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio, convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Guimarães, Nelciele Cavaliéri de Alencar.

Produção, purificação e caracterização bioquímica de pectinases de *Aspergillus japonicus* e *Thermoascus aurantiacus*: aplicação da enzima de *A. japonicus* na clarificação de sucos de frutas. – Campo Grande, 2023.

132 f.

Orientadora: Giannesi, Giovana Cristina.

Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS. Instituto de Biociências, 2023.

1. pectinase. 2. Poligalacturonase. 3. *Aspergillus japonicus*. 4. *Thermoascus aurantiacus*. 5. clarificação de sucos.

## TERMO DE APROVAÇÃO

NELCIELE CAVALIERI DE ALENCAR GUIMARÃES

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE  
PECTINASES DE *Aspergillus japonicus* E *Thermoascus aurantiacus*: APLICAÇÃO DA  
ENZIMA DE *A. japonicus* NA CLARIFICAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS**

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

10 de março de 2023

**Comissão Examinadora:**

---

**Prof. Dra. Marina Kimiko Kadowaki**  
Unioeste

---

**Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite**  
UFGD

---

**Prof. Dra. Karina Márcia Ribeiro de Souza Nascimento**  
UFMS

---

**Prof Dr. Edson dos Anjos dos Santos**  
UFMS

---

**Prof<sup>a</sup> Dra Giovana Cristina Giannesi**  
UFMS

## AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, meu refúgio, minha força, meu exemplo, meu tudo. Sem Ele nada na minha vida teria dado tão certo, desde a minha graduação, meu mestrado, meu concurso, tudo. Obrigada Senhor por estar sempre ao meu lado, me dando forças para não desistir diante das dificuldades, que sempre existirão, me guiando e me orientando, me ajudando a chegar até aqui na conclusão de mais uma etapa muito importante da minha vida profissional, a tão esperada conclusão do meu doutorado.

À minha família, meu marido Bruno Gustavo de Oliveira Cavaliere, meu presente de Deus, benção da minha vida, por todo apoio e toda paciência, em todos os momentos, em todos esses 14 anos de amor e cumplicidade. Obrigada meu amor por estar sempre me apoiando tanto na minha vida pessoal, quanto na profissional, largando tudo para me acompanhar em todos os meus projetos, até os internacionais, sem você eu não teria conseguido realizar meu sonho de morar nos Estados Unidos, gratidão eterna por isso, e por tudo amor da minha vida. E ao meu filho, Vitor Cavaliere de Oliveira, que me dá muita força e muitas alegrias, é por você que a mamãe batalha em crescer profissionalmente para te dar uma vida mais confortável meu companheirinho lindo do dia a dia que mamãe ama demais, meu presente de Deus, minha maior benção.

À minha mãe, Celia Cavaliere de Alencar, que tanto me ajudou cuidando do netinho querido dela para eu poder fazer meus experimentos ou estudar, obrigada mãe por todo seu apoio, por estar ao meu lado nos momentos que mais precisei, sem a sua ajuda também não teria chegado até aqui dentro do prazo correto.

À minha orientadora Giovana Cristina Giannesi, que tenho o prazer de ter como orientadora desde minha iniciação científica em 2008. Agradeço por sempre estar ao meu lado me orientando mais do que da melhor forma possível, me atendendo sempre que precisei, tanto na parte profissional como orientadora, como na parte pessoal, como amiga, já que somos colegas de laboratório no LBq, e comadres, madrinha do meu filho, obrigada por tudo, eterna gratidão.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica Geral de Microrganismos que também me apoiaram sempre que precisei, em especial os professores que mais participaram das etapas do meu doutorado, cada um de contribuindo com alguma coisa: Douglas Masui, Fabiana Zanoelo, Roberto Ruller, Malson Lucena e Jeandre Augusto.

Aos meus colegas técnicos Carla Leite, Clarice Marchetti, Eder Doná, Thais Novaes e Luana Wilda, cada um me apoiando de uma forma, gratidão a todos.

Aos alunos do laboratório LBq que me ajudaram sempre que precisei, Nathália Glienke, Jessica Schlosser, João Ribeiro, Rhaírys Trindade, Rodrigo Galeano, Murilo Kioshi, Isabela Pavão, Aline Almeida, Amanda Dal Ongaro, Ana Lorena, gratidão pela parceria.

À UFMS por me proporcionar a oportunidade de alcançar grandes conquistas desde minha graduação em Biologia em 2010 até aqui no meu doutorado, me dando as licenças do trabalho como técnica do laboratório LBq da UFMS, que me proporcionaram o tempo necessário para conseguir concluir o doutorado, assim como o afastamento para fora do país no meu doutorado sanduiche em Stillwater-Oklahoma/USA.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, que me deu a oportunidade para fazer meu doutorado, em especial ao professor Malson Lucena, coordenador do programa, sempre prestativo e atencioso, me ajudando sempre que precisei.

Ao professor Dr Rolf Prade, meu orientador no doutorado sanduiche na Oklahoma State University (OSU) em Stillwater, Oklahoma, Estados Unidos, por me dar esta oportunidade maravilhosa que me agregou muito profissionalmente e pessoalmente, me ajudando na realização de um sonho desde menina. E ao aluno de doutorado de sanduiche que conheci lá, Alex Contato, da USP de Ribeirão Preto/SP, por todo o apoio no tempo que trabalhamos juntos no laboratório do professor Rolf e até após nosso período lá, gratidão.

À CAPES, que foi a principal ajuda que me proporcionou a oportunidade de fazer meu doutorado sanduiche, me trazendo muita experiencia, tanto profissional quanto pessoal, a tão sonhada fluência no inglês.

Aos membros da banca de qualificação: Jeandre Augusto, Alda Ferreira e Charles Kiefer, por todas as sugestões enriquecedoras.

Aos membros da banca de defesa da tese: Marina Kadowaki, Rodrigo Leite, Karina Nascimento e Edson Santos, por aceitarem participar da minha defesa de doutorado. Obrigada por todos os elogios que me fizeram após a defesa, e também por todas as críticas e/ou sugestões que enriqueceram ainda mais meu trabalho.

*Provérbios 3:5*

*“Confie no Senhor de todo o seu coração e não te estribes no teu próprio entendimento.”*

GUIMARÃES, Nelciele Cavalieri de Alencar. **Produção, purificação e caracterização bioquímica de pectinases de *Aspergillus japonicus* e *Thermoascus aurantiacus*: aplicação da enzima de *A. japonicus* na clarificação de sucos de frutas.** Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2023.

## RESUMO

O desenvolvimento de alternativas inovadoras e sustentáveis para agregar valor aos resíduos de biomassa lignocelulósica provenientes de fontes agrícolas e alimentares é necessário no mundo todo. A biomassa lignocelulósica é uma fonte de recursos renováveis por ser uma matéria orgânica constituída de uma complexa matriz de polissacarídeos, incluindo celulose, hemicelulose e pectina. As pectinases são um grupo complexo de enzimas que degradam substâncias pécnicas e são muito utilizadas pelas indústrias. Estas são usadas principalmente na indústria alimentícia, como nas indústrias de sucos de frutas, onde seu uso aumenta o rendimento e a qualidade do produto final. Neste contexto, o objetivo geral foi estudar a produção de pectinases pelos fungos *Aspergillus japonicus* e *Thermoascus aurantiacus* usando substratos de baixo custo e analisar as suas aplicações na clarificação de sucos de frutas. A melhor produção de pectinase por *T. aurantiacus* foi em SSC com farinha de mandioca de Rondonópolis/MT com 26,7 U/g de substrato seco (ou 2,67 U/mL). E para *A. japonicus* foi observado que a maior produção de pectinase foi com casca de maracujá em SSC (30 U/g de substrato seco ou 3 U/mL). Para *T. aurantiacus*, 96 h de crescimento foi o melhor tempo, enquanto para *A. japonicus* foi 48 h. Na avaliação dos efeitos do pH e temperatura para atividade das enzimas, *T. aurantiacus* teve pH 4,0 e 70 °C como parâmetros ótimos, e *A. japonicus* pH 4,0 e 60 °C. Na avaliação da estabilidade, a pectinase de *A. japonicus* (extrato bruto) ficou totalmente estável durante 4 h em todos os pHs testados. Sobre termoestabilidade, a pectinase de *A. japonicus* se manteve estável durante 6 h a 25 °C, e após as 24 h de teste ainda manteve 74% da atividade inicial. A 50 °C a enzima manteve 71% de atividade durante 6 h. A pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* foi avaliada na clarificação de 13 polpas e foi superior à pectinase comercial (Pectinex) em todas as frutas avaliadas. A melhor clarificação obtida usando 3 U/mL da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* foi em manga (Haden) com 85,56%, enquanto a Pectinex clarificou apenas 50,89%. Com a maçã (Argentina), a pectinase de *A. japonicus* foi 5 vezes mais eficiente na clarificação do que a Pectinex, com 66,32% e 12,67% de clarificação, respectivamente. A pectinase de *T. aurantiacus* foi purificada em duas etapas cromatográficas (DEAE-fractogel e sephacryl S-200), com atividade específica de 75,7 U/mg proteína, resultando em um fator de purificação de 10 vezes com 21% de rendimento. E a pectinase de *A. japonicus* também foi semi-purificada em duas etapas cromatográficas (DEAE-fractogel e fenil-sepharose), resultando em uma purificação de 2,9 vezes com 81% de rendimento e uma atividade específica de 7,9 U/mg de proteína, exibindo um peso molecular de cerca de 40 kDa (nomeada como PGAj). Na espectrometria de massas (LC-MS/MS) de PGAj uma poligalacturonase de 29,99 kDa foi a mais abundante. O pH e a temperatura ótimos para a atividade da PGAj foram pH 4,0 e 55 °C, respectivamente. Além disso, a enzima PGAj reteve acima de 90% da sua atividade inicial por 4 h em pH 4,0, 5,0 e 6,0. A enzima manteve 83% de atividade residual após 20 min a 50 °C. No teste de especificidade, A PGAj teve a pectina cítrica como substrato preferido, seguida de pectina de maçã e ácido poligalacturônico. Para os testes de clarificação de sucos pela PGAj também foram usadas 13 polpas, onde o melhor resultado obtido foi com as polpas de manga (Palmer e Tommy), com 65% e 41%, enquanto a Pectinex clarificou apenas 49% e 21%, respectivamente. Em seguida a goiaba branca, a banana nanica e a maçã gala, tiveram 40%, 11% e 9,4% de clarificação, respectivamente. O melhor resultado obtido na imobilização foi com alginato de sódio 2%, usando 0,1 M de CaCl<sub>2</sub>. Nos testes de reuso a PGAj imobilizada manteve 100% de atividade após 6 ciclos de reação usando pectina 1% como substrato. Conclui-se que a pectinase (extrato bruto) e a semi-purificada de *A. japonicus* mostraram potencial para aplicação em indústrias de bebidas, para contribuir com uma produção eficiente e econômica de sucos de frutas mais claros.

**Palavras-chave:** pectinase, poligalacturonase, *Aspergillus japonicus*, *Thermoascus aurantiacus*, clarificação de sucos.

GUIMARÃES, Nelciele Cavalieri de Alencar. **Production, purification and biochemical characterization of pectinases from *Aspergillus japonicus* and *Thermoascus aurantiacus*: application of the *A. japonicus* enzyme in the clarification of fruit juices.** Thesis (PhD in Biochemistry and Molecular Biology) - Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2023.

### ABSTRACT

The development of innovative and sustainable alternatives to add value to agricultural and food waste (lignocellulosic biomass) is needed worldwide. Lignocellulosic biomass is a source of renewable resources because it is an organic matter made up of a complex matrix of polysaccharides, including cellulose, hemicellulose and pectin. Pectinases are a complex group of enzymes that degrade pectic substances widely used by industries, mainly in the food industry. In this context, the general objective of this study was the production of pectinases by two fungi (*Aspergillus japonicus* and *Thermoascus aurantiacus*) using low-cost substrates (agribusiness residues/products), as well as the purification and biochemical characterization of the enzymes, followed by immobilization and application of pectinase from *A. japonicus* in the clarification of fruit juices. In this context, the general objective was to study the production of pectinases by the fungi *Aspergillus japonicus* and *Thermoascus aurantiacus* using low-cost substrates and to analyze their applications in the clarification of fruit juices. The best pectinase production by *T. aurantiacus* was in SSC with cassava flour from Rondonópolis/MT with 26.7 U/g of dry substrate (or 2.67 U/mL). And for *A. japonicus* it was observed that the highest production of pectinase was with passion fruit peel in SSC (30 U/g of dry substrate or 3 U/mL).

For *T. aurantiacus*, 96 hours of growth was the best time, while for *A. japonicus* it was 48 hours. In evaluating the effects of pH and temperature on enzyme activity, *T. aurantiacus* had pH 4.0 and 70 °C as optimal parameters, and *A. japonicus* pH 4.0 and 60 °C. In the stability evaluation, pectinase from *A. japonicus* (crude extract) was completely stable for 4 hours at all tested pHs. About thermostability, pectinase from *A. japonicus* remained stable for 6 hours at 25 °C, and after 24 hours of testing it still maintained 74% of the initial activity. At 50 °C the enzyme maintained 71% activity for 6 hours. The pectinase (crude extract) of *A. japonicus* was evaluated in the clarification of 13 pulps and was superior to the commercial pectinase (Pectinex) in all evaluated fruits. The best clarification obtained using 3 U/mL of crude pectinase from *A. japonicus* was in mango (Haden) with 85.56%, while Pectinex clarified only 50.89%. With apple (Argentina), pectinase from *A. japonicus* was 5 times more efficient in clarification than Pectinex, with 66.32% and 12.67% clarification, respectively. *T. aurantiacus* pectinase was purified in two chromatographic steps (DEAE-fractogel and Sephacryl S-200), with specific activity of 75.7 U/mg protein, resulting in a 10-fold purification with 21% enzyme recovery. And pectinase from *A. japonicus* was also semi-purified in two chromatographic steps (DEAE-fractogel and fenil-sepharose), resulting in a 2.9-fold purification with 81% enzyme recovery and a specific activity of 7.9 U/mg protein, exhibiting a molecular weight of about 40 kDa (named as PGAj). In mass spectrometry (LC-MS/MS) of PGAj a polygalacturonase of 29.99 kDa was the most abundant. The optimum pH and temperature for PGAj activity were pH 4.0 and 55 °C, respectively. Furthermore, the PGAj enzyme retained over 90% of its initial activity for 4 hours at pH 4.0, 5.0 and 6.0. The enzyme maintained 83% of residual activity after 20 min at 50 °C. In the specificity test, PGAj had citrus pectin as the preferred substrate, followed by apple pectin and polygalacturonic acid. For the juice clarification tests by PGAj, 13 pulps were also used, where the best result was obtained with mango pulps (Palmer and Tommy), with 65% and 41%, while Pectinex clarified only 49% and 21%, respectively. Then the white guava, the banana “nanica” and the gala apple, had 40%, 11% and 9.4% of clarification, respectively. The best result of immobilization obtained was with 2% sodium alginate, using 0.1 M CaCl<sub>2</sub>. In reuse tests, immobilized PGAj maintained 100% activity after 6 reaction cycles using 1% pectin as substrate. It is concluded that crude and semi-purified pectinase from *A. japonicus* showed potential for application in beverage industries, to contribute to an efficient and economical production of clearer fruit juices.

**Keywords:** pectinase, polygalacturonase, *Aspergillus japonicus*, *Thermoascus aurantiacus*, clarification of juices.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1A.</b> Esboço das estruturas da parede celular vegetal.....	22
<b>Figura 1B.</b> Estrutura da parede celular primária e lamela média.....	22
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática das estruturas de pectinas.....	23
<b>Figura 3.</b> Divisão de funções das enzimas pectinolíticas.....	26
<b>Figura 4.</b> Mecanismo sequencial de ação das enzimas pectinolíticas.....	27
<b>Figura 5.</b> Publicações de pesquisas na produção de pectinases de diferentes fontes nas últimas duas décadas (1995-2020).....	28
<b>Figura 6.</b> <i>Aspergillus japonicus</i> .....	37
<b>Figura 7.</b> <i>Thermoascus aurantiacus</i> .....	38
<b>Figura 8.</b> Efeito do tempo de crescimento para produção de pectinase (extrato bruto) por <i>A. japonicus</i> .....	56
<b>Figura 9.</b> Efeito do pH na atividade da pectinase (extrato bruto) de <i>A. japonicus</i> .....	57
<b>Figura 10.</b> Efeito da temperatura na atividade da pectinase (extrato bruto) de <i>A. japonicus</i> .....	58
<b>Figura 11.</b> Efeito do pH na estabilidade da pectinase (extrato bruto) de <i>A. japonicus</i> .....	59
<b>Figura 12.</b> Efeito da temperatura na estabilidade da pectinase (extrato bruto) de <i>A. japonicus</i> .....	60
<b>Figura 13.</b> Clarificação do suco de manga (Palmer) pela pectinase (extrato bruto) de <i>A. japonicus</i> .....	62
<b>Figura 14.</b> Diferentes tempos de tratamento para clarificação do suco de manga (Haden) usando a pectinase (extrato bruto) de <i>A. japonicus</i> .....	64
<b>Figura 15.</b> Diferentes concentrações da pectinase (extrato bruto) de <i>A. japonicus</i> na clarificação de suco de manga (Haden).....	65
<b>Figura 16.</b> Perfil cromatográfico da atividade pectinolítica de <i>A. japonicus</i> em coluna DEAE-Fractogel.....	66
<b>Figura 17.</b> Perfil eletroforético da pectinase semi-purificada (PGAj).....	67
<b>Figura 18.</b> Efeito do pH na atividade da PGAj.....	70
<b>Figura 19.</b> Efeito da temperatura na atividade da PGAj.....	70
<b>Figura 20.</b> Efeito do pH na estabilidade da PGAj.....	71
<b>Figura 21.</b> Efeito da temperatura na estabilidade da PGAj.....	72
<b>Figura 22.</b> Clarificação do suco de manga (Palmer) usando PGAj.....	75
<b>Figura 23.</b> Diferentes tempos de tratamento para clarificação do suco de manga (Palmer) usando a PGAj.....	76
<b>Figura 24.</b> Diferentes concentrações da PGAj na clarificação de suco de manga (Palmer).....	77

<b>Figura 25.</b> Efeito de diferentes concentrações de cloreto de cálcio na imobilização da PGAj...	78
<b>Figura 26.</b> Efeito de diferentes concentrações de alginato de sódio na imobilização da PGAj..	79
<b>Figura 27.</b> Reuso da PGAj imobilizada.....	80
<b>Figura 28.</b> Efeito do tempo de crescimento para produção de pectinase por <i>T. aurantiacus</i> .....	83
<b>Figura 29.</b> Efeito do pH na atividade da pectinase de <i>T. aurantiacus</i> .....	84
<b>Figura 30.</b> Efeito da temperatura na atividade da pectinase de <i>T. aurantiacus</i> .....	85
<b>Figura 31.</b> Perfil cromatográfico da pectinase de <i>T. aurantiacus</i> em coluna DEAE-fractogel..	86
<b>Figura 32.</b> Perfil cromatográfico da pectinase de <i>T. aurantiacus</i> em coluna Sephacryl S-200..	86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Enzimas pectinolíticas que degradam as substâncias pécticas.....	24
<b>Tabela 2.</b> Comparação de SC e SSC do ponto de vista do processo “up”, “mid” e “downstream”.....	30
<b>Tabela 3.</b> Produção de pectinase (extrato bruto) por <i>A. japonicus</i> usando diferentes fontes de carbono.....	53
<b>Tabela 4.</b> Aplicação da pectinase (extrato bruto) de <i>A. japonicus</i> na clarificação de sucos de frutas.....	61
<b>Tabela 5.</b> Purificação da pectinase extracelular de <i>A. japonicus</i> .....	66
<b>Tabela 6.</b> Identificação de diferentes pectinases da amostra semi-purificada de <i>A. japonicus</i> (LC-MS/MS).....	68
<b>Tabela 7.</b> Especificidade ao substrato da PGAj.....	73
<b>Tabela 8.</b> Clarificação de sucos de frutas com a PGAj e pectinase comercial Pectinex.....	74
<b>Tabela 9.</b> Produção de pectinase por <i>T. aurantiacus</i> usando diferentes fontes de carbono.....	81
<b>Tabela 10.</b> Purificação da pectinase de <i>T. aurantiacus</i> .....	87

## LISTA DE APÊNDICES

### **A – ARTIGO referente ao capítulo 1 aceito para publicação na revista “Waste and Biomass Valorization”:**

“Production and biochemical characterization of *Aspergillus japonicus* pectinase using a low-cost alternative carbon source for application in the clarification of fruit juices”

### **B – ARTIGO referente ao capítulo 2 publicado:**

“Polygalacturonase from *Aspergillus japonicus* (PGAj): Enzyme production using low-cost carbon source, biochemical properties and application in clarification of fruit juices”

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 39 (2022) 102233.

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102233>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878818121003297?via%3Dihub>.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AE: atividade específica  
ANOVA: análise de variância unidirecional  
AR: atividade relativa  
BCE: bagaço de cana explodido  
BDA: batata-dextrose-ágar  
BL: bagaço de laranja em pó  
CEL: casca extrusada de laranja  
CL: casca de laranja em pó  
CM: casca de maracujá em pó  
cov: cobertura da sequência de aminoácidos das proteínas identificadas  
CS: cultivo submerso  
DEAE: dietilaminoetil  
DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico  
DP: desvio padrão  
EC: “Enzyme Commission”  
EM6US erva-mate de tereré média fina usada  
EM7US: erva-mate de tereré grossa usada  
EMFC: erva-mate fina de chimarrão  
EMFCUS: erva-mate fina de chimarrão usada  
EMTG: erva-mate de tereré grossa  
EMTMF: erva-mate de tereré média fina  
FFD: farinha de mandioca de Furnas do Dionísio/MS  
FGC: farinha de mandioca grossa Cuiabana/MT  
FGCSA: farinha de mandioca grossa Cruzeiro do Sul/Acre  
FGP: farinha de mandioca grossa do Pará  
FM: farinha de milho  
FR: farinha de mandioca de Rondonópolis/MT  
FS: farinha de soja  
FT: farelo de trigo  
G: glicose  
GalA: ácido D-galacturônico  
HG: homogalacturonana ou galacturonana

iBAQ: composição molar

OFAT: um fator por vez

P: fator de purificação

PAGE: Poliacrylamide Gel Eletrophoresis

pep: número de hits de peptídeos únicos

PG: poligalacturonase

PGL: Pectato liase ou poligalacturonato liase

PMi: palha de milho

PMGL: Pectina liase ou polimetilgalacturonato liase

PPase-A: protopectinase tipo A

PPase-B: protopectinase tipo B

Prot ID: identificação da proteína

PTN: proteína

RG: ramnogalacturonana

RGI: ramnogalacturonana tipo I

RGII: ramnogalacturonanas II ou galacturonas

RPPN: Reserva Particular do Patrimônio Natural

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate – Poliacrylamide Gel Eletrophoresis

SR: segundo Rizzatti

SSC: cultivo em estado sólido

Tris.HCl: Tris.Hydrochloride

Tc: transmitância do controle

Tt: transmitância do teste

U/mL: unidades por mililitro

UT: unidades totais

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>21</b>
2.1. Biomassa lignocelulósica.....	21
2.2. Pectina.....	22
2.3. Pectinases – classificação e mecanismos de ação.....	24
2.4. Organismos produtores de enzimas pectinolíticas.....	27
2.4.1. Pectinases microbianas.....	28
2.5. Estratégias para produção de pectinases.....	30
2.5.1. Cultivo em meio de baixo custo e tipo de meio de cultivo.....	30
2.5.2. Determinação dos parâmetros bioquímicos para aplicação das pectinases.....	33
2.6. Aplicação industrial das pectinases.....	35
2.6.1. Aplicação das pectinases nas indústrias de sucos de frutas.....	35
2.7. Fungos utilizados no estudo: <i>Aspergillus japonicus</i> e <i>Thermoascus aurantiacus</i> .....	37
2.7.1. <i>Aspergillus japonicus</i> .....	37
2.7.2. <i>Thermoascus aurantiacus</i> .....	38
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
3.1. Objetivo geral.....	39
3.2. Objetivos específicos.....	39
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
4.1. Microrganismos e manutenção de crescimento.....	41
4.2. Produção de pectinase em cultivo submerso (SC) e cultivo em estado sólido (SSC) usando diferentes substratos.....	41
4.3. Efeito do tempo de crescimento para produção de pectinase.....	42
4.4. Ensaio enzimático e proteico.....	43
4.5. Caracterização enzimática.....	44
4.5.1. Efeito do pH na atividade da pectinase.....	44
4.5.2. Efeito da temperatura na atividade da pectinase.....	44
4.5.3. Efeito do pH na estabilidade da pectinase.....	44
4.5.4. Efeito da temperatura na estabilidade da pectinase.....	45
4.6. Purificação enzimática.....	45

4.7. Determinação do grau de pureza da pectinase semi-purificada de <i>A. japonicus</i> (PGAj).....	46
4.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes – SDS-PAGE.....	46
4.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (PAGE).....	47
4.7.3. Zimograma.....	47
4.7.4. Coloração dos géis de eletroforese.....	47
4.8. Cromatografia líquida com espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS).....	48
4.9. Caracterização enzimática da PGAj.....	48
4.9.1. pH e temperatura ótimos para atividade da PGAj.....	48
4.9.2. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da PGAj.....	48
4.10. Especificidade da PGAj ao substrato.....	49
4.11. Imobilização da PGAj em alginato de cálcio.....	49
4.11.1. Efeito da concentração de CaCl <sub>2</sub> na imobilização da PGAj.....	49
4.11.2. Efeito da concentração de alginato de sódio na imobilização da PGAj.....	50
4.11.3. Reuso da PGAj imobilizada.....	50
4.12. Aplicação da pectinase (extrato bruto) e semi-purificada de <i>A. japonicus</i> na clarificação de sucos.....	50
4.12.1. Efeito do tempo de tratamento e da concentração de pectinase (extrato bruto) e da PGAj na clarificação do suco de manga (Palmer).....	51
4.13. Microscopia óptica.....	52
4.14. Análise dos resultados.....	52
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>5. CAPÍTULO 1. Produção e caracterização bioquímica da pectinase (extrato bruto) de <i>A. japonicus</i> e aplicação da enzima na clarificação de sucos de frutas.....</b>	<b>53</b>
5.1. Produção de pectinases extracelulares (extrato bruto) por <i>A. japonicus</i> usando diferentes substratos em cultivo submerso (SC) e em estado sólido (SSC).....	53
5.2. Efeito do tempo de crescimento para produção da pectinase (extrato bruto) de <i>A. japonicus</i> .....	56
5.3. Caracterização bioquímica da pectinase (extrato bruto) de <i>A. japonicus</i> .....	57
5.3.1. Efeito do pH e da temperatura na atividade da pectinase (extrato bruto).....	57
5.3.2. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da pectinase (extrato bruto).....	59
5.4. Aplicação da pectinase (extrato bruto) de <i>A. japonicus</i> na clarificação de sucos de frutas..	60
5.4.1. Efeito do tempo de tratamento para clarificação do suco de manga (Haden) usando a pectinase (extrato bruto) de <i>A. japonicus</i> .....	63

5.4.2. Diferentes concentrações da pectinase (extrato bruto) de <i>A. japonicus</i> na clarificação de suco de manga (Haden).....	64
---	----

**6. CAPÍTULO 2.** Purificação, Caracterização e Imobilização da pectinase de *Aspergillus japonicus* e aplicação da enzima na clarificação de sucos de frutas.....66

6.1. Purificação enzimática da pectinase de *A. japonicus*.....66

6.1.1. Determinação do grau de pureza da pectinase semi-purificada de *A. japonicus* (PGAj)..67

6.1.1.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), condições nativas (PAGE) e Zimograma.....67

6.1.1.2. Cromatografia líquida com espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) .....68

6.2. Caracterização bioquímica da PGAj.....69

6.2.1. Efeito do pH e da temperatura na atividade da PGAj.....69

6.2.2. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da enzima.....71

6.2.3. Especificidade da PGAj.....73

6.3. Aplicação da PGAj na clarificação de sucos.....73

6.3.1. Efeito do tempo de tratamento para clarificação do suco de manga (Palmer) usando a PGAj.....76

6.3.2. Diferentes concentrações da PGAj na clarificação de suco de manga (Palmer).....76

6.4. Imobilização da PGAj usando alginato de cálcio.....77

6.4.1. Efeito da concentração de CaCl<sub>2</sub> na imobilização da PGAj.....77

6.4.2. Efeito da concentração de alginato de sódio na imobilização da PGAj.....78

6.4.3. Reuso da PGAj imobilizada.....79

**7. CAPÍTULO 3.** Produção, purificação e caracterização da pectinase de *Thermoascus aurantiacus*.....81

7.1. Produção de pectinase por *T. aurantiacus* usando diferentes substratos de baixo custo – cultivo submerso (SC) e em estado sólido (SSC).....81

7.2. Efeito do tempo de crescimento para produção de pectinase por *T. aurantiacus*.....83

7.3. Caracterização bioquímica da pectinase de *T. aurantiacus*.....84

7.3.1. Efeito do pH na atividade da pectinase.....84

7.3.2. Efeito da temperatura na atividade da pectinase de *T. aurantiacus*.....85

7.4. Purificação enzimática da pectinase de *T. aurantiacus*.....86

**8. CONCLUSÃO.....88**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....89**

**APÊNDICES**

A – Production and biochemical characterization of *Aspergillus japonicus* pectinase using a low-cost alternative carbon source for application in the clarification of fruit juices.....101

B – Polygalacturonase from *Aspergillus japonicus* (PGAj): Enzyme production using low-cost carbon source, biochemical properties and application in clarification of fruit juices”.....123

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos são excelentes decompositores de material orgânico e, em função de suas características de reprodução e crescimento, adaptam-se a uma variedade de substratos. Pesquisas sobre a produção de enzimas por fungos mesófilos e termófilos, juntamente com o aumento da diversidade de substratos alternativos, que hoje são produzidos como toneladas de resíduos pelas indústrias, têm crescido significativamente nos últimos anos (Garzon et al., 2021; Kaur et al., 2020; Rocha et al., 2020; Vaz et al., 2020; Zehra et al., 2020). Pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam substâncias pécnicas e são uma das enzimas mais comercializadas, sobretudo para a indústria alimentícia.

Frutas ricas em pectina (um heteropolímero encontrado na biomassa vegetal) geram sucos com alta viscosidade e turbidez, uma vez que durante o processo de separação, os mesmos arrastam resíduos de pectina e outros polissacarídeos de parede celular, principalmente o amido. Dependendo do modo de ação, as pectinases são classificadas em poligalacturonases, pectina esterases, pectina liases e pectato liases. A adição de pectinases e outras enzimas despolimerizantes é amplamente utilizada na indústria de processamento de frutas e vegetais, pois hidrolisam esses compostos promovendo a redução da viscosidade dos sucos e assim, aumentam o tempo de vida do produto, e facilitam os processos de extração, maceração, liquefação e de clarificação.

As pectinases microbianas são responsáveis por 25% do valor global de enzimas alimentícias comercializadas. A maioria das preparações comerciais de pectinases são produzidas por fungos, sendo a espécie *Aspergillus niger* a principal produtora. Entretanto, para que as pectinases possam ser aplicadas na indústria é necessário que as mesmas sejam estáveis, atuando em valores extremos de temperatura e pH. Estudos de metodologias e estratégias que forneçam às enzimas a capacidade de catalisar reações em condições não usuais são de grande interesse para o desenvolvimento dos processos industriais (Cavaliere de Alencar Guimarães et al., 2022).

A imobilização em suportes sólidos é uma estratégia que pode melhorar a estabilidade de biocatalisadores, através do enrijecimento molecular causado pela ligação da enzima ao suporte e pela criação de um microambiente protegido. Estudos sobre estratégias de purificação que utilizam processos únicos, simples, de baixo custo podendo produzir altos fatores de purificação e de recuperação de enzimas, são de grande interesse para a indústria biotecnológica (Muller et al., 2022; John et al., 2020; Vaz et al., 2020).

Somados a isso, para a produção de enzimas é muito importante a utilização de fontes indutoras alternativas e de baixo custo, principalmente aquelas consideradas resíduos agroindustriais de biomassas vegetais, como casca de maracujá, bagaço de cana e erva-mate. Assim, este trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar pectinases usando substratos de baixo custo como indutores de produção enzimática e testar sua aplicação na clarificação de sucos de frutas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

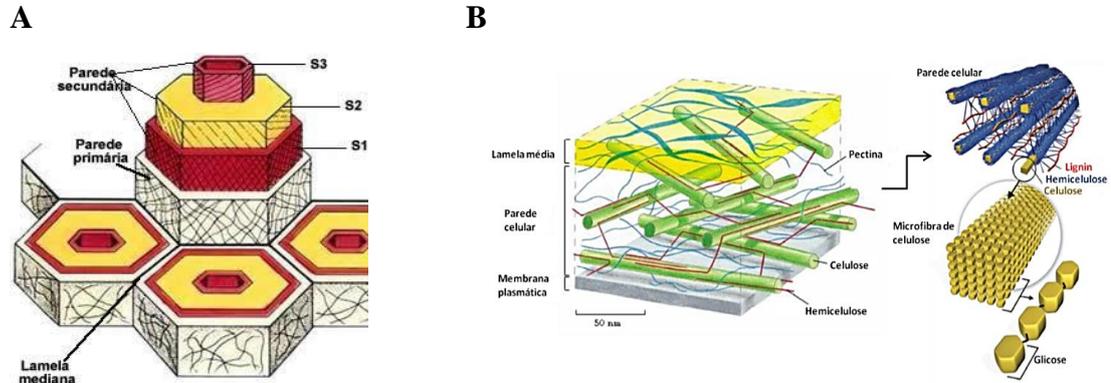
### 2.1. Biomassa lignocelulósica

A expansão da produção agrícola está cada vez mais acelerada devido ao aumento da necessidade por alimentos ocasionado pelo crescimento populacional. Conseqüentemente, este crescimento resulta na geração de maiores quantidades de resíduos agrícolas. Mas, a fiscalização dos órgãos públicos ambientais e a sociedade cobram das agroindústrias ações que busquem cada vez mais o uso de novas tecnologias ambientais para destinação dos resíduos da produção, o que pode reduzir drasticamente os impactos causados ao meio ambiente. Além disso, isto pode agregar valor comercial e aumentar a rentabilidade dos empreendimentos (Tessmann et al., 2021). Portanto, o desenvolvimento de alternativas inovadoras e sustentáveis para agregar valor aos resíduos agrícolas e alimentares (biomassa lignocelulósica) é necessário no mundo todo (Muller et al., 2022).

A biomassa lignocelulósica é uma fonte de recursos renováveis por ser uma matéria orgânica de origem vegetal, constituída de uma complexa matriz de polissacarídeos, incluindo celulose, hemicelulose, pectina e pequenas quantidades de extrativos vegetais, sais minerais e proteínas. A composição da parede celular vegetal lignocelulósica varia dependendo da espécie da planta, idade, tempo de colheita, condição e/ou estágio de crescimento (Infante, 2019).

A principal função da parede celular vegetal é evitar que a membrana plasmática das células se rompa, garantindo à célula elasticidade e resistência a tensões físicas e químicas, ou seja, suporte mecânico e defesa contra patógenos e insetos. Além disso, a parede celular controla o transporte de substâncias entre células vizinhas, evitando por exemplo lise osmótica por entrada excessiva de água. Ela é dividida morfologicamente em três regiões distintas (**Figura 1A**): parede secundária (S1, S2 e S3), composta por celulose, hemicelulose e lignina; parede primária, que é composta por microfibrilas de celulose (~30%), hemicelulose (~30%),

pectina (~30%) e proteínas estruturais (~10%); e lamela média, que é rica em pectina (**Figura 1B**) (Raven et al., 2001; Infante, 2019).



**Figura 1A).** Esboço das estruturas da parede celular vegetal, sendo S1, S2 e S3 as 3 camadas da parede secundária (*Fonte:* Raven et al., 2001). **B)** Representação dos componentes da parede celular vegetal. *Fonte:* Evangelista, 2017.

## 2.2. Pectina

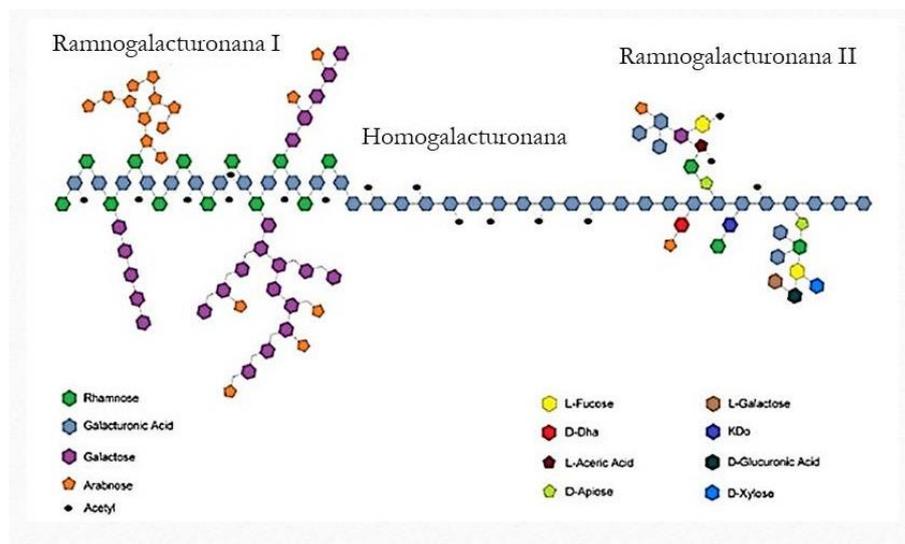
A pectina é encontrada na parede celular vegetal juntamente com polímeros de celulose e hemicelulose, conferindo aos tecidos vegetais, estrutura, firmeza e resistência à compressão. Devido à presença de grupos polares, possui caráter hidrofílico, portanto tem característica de reter moléculas de água, e está relacionada ao transporte de íons, além do crescimento, tamanho e forma das células vegetais. Além disso, produz uma substância viscosa, contribuindo para a adesão entre as células vegetais. As pectinas são consideradas polissacarídeos complexos e heterogêneos e constituem de 4-30% das cascas de frutas cítricas, as quais são extraídas para serem utilizadas como estabilizantes na indústria de alimentos (Infante, 2019).

Sua cadeia principal é formada por centenas de resíduos de ácido D-galacturônico (GalA) unidos por ligação  $\alpha$ -1,4, e apresenta cadeias laterais formadas principalmente por açúcares como ramnose, galactose, arabinose e xilose (**Figura 2**) (Polizeli et al., 2013). A porção linear da cadeia principal, conhecida como homogalacturonana (HG) ou galacturonana, contém homopolímeros lineares de resíduos de ácido D-galacturônico, cujos grupos ácidos estão parcialmente/totalmente esterificados com grupos metila, resultando em uma maior resistência a hidrólise da ligação glicosídica (Pinheiro et al., 2017).

A porção ramificada é conhecida como ramnogalacturonana (RG), sendo classificada em tipo I e tipo II. As ram galactomananas I (RGI) consistem em uma cadeia principal de

unidades alternadas de ácido  $\alpha$ -1,4-D-galacturônico e  $\alpha$ -1,2-ramnose. A incorporação da ramnose em intervalos aleatórios dentro da cadeia principal resulta na torção em outra cadeia linear, à qual se ligam cadeias laterais de arabinoses e galactoses (Infante, 2019).

As ramnogalacturonanas II (RGII) ou galacturonas consistem em uma cadeia principal com aproximadamente nove ligações de ácido galacturônicos com quatro cadeias laterais complexas, consistindo em 12 monossacarídeos diferentes e 20 ligações distintas. Apesar do nome, não tem ramnose na cadeia principal da RGII, somente HG com cadeias laterais complexas ligadas a resíduos de GalA (Polizeli et al., 2013).



**Figura 2.** Representação esquemática das estruturas de pectinas (Polizeli et al., 2013)

Tratando-se de um polissacarídeo tão complexo, a pectina na verdade é uma mistura de substâncias que são chamadas de substâncias pécnicas. Com base no tipo de modificações da cadeia principal, as substâncias pécnicas são classificadas em protopectina, ácido pécnico, ácido pectínico e pectina (Pinheiro et al., 2017).

As protopectinas são as substâncias pécnicas encontradas em tecidos de plantas intactas, como frutos verdes. São altamente insolúveis e compostas por unidades de ácidos galacturônicos ligados ao cálcio por ligações iônicas. Na fase de pleno desenvolvimento das frutas, a protopectina é abundante e age como uma “cola”, conectando as paredes celulares de diferentes células vegetais. E no processo de amadurecimento ela é transformada em pectina (Infante, 2019).

Os ácidos pécnicos são galacturonanas solúveis em água contendo pequena quantidade de grupos esterificados (metoxila). Os ácidos pectínicos apresentam de 0 a 75% de grupos esterificados (tornando-se mais insolúvel), e possuem a propriedade de formar gel na presença

de grandes quantidades de açúcares (>65 %) e baixo pH, sendo utilizados em preparações como geléias e doces de frutas, por exemplo. E a pectina apresenta um mínimo de 75 % de grupos esterificados (Infante, 2019; Pinheiro et al., 2017).

### 2.3. Pectinases – classificação e mecanismos de ação

As pectinases são um grupo complexo de enzimas que degradam as substâncias pécticas e são classificadas em 3 categorias principais baseado no seu mecanismo de ação (**Tabela 1**): protopectinases, desesterificantes (esterases) e despolimerizantes (hidrolases e liases).

As protopectinases são principalmente de dois tipos: protopectinase tipo A (PPase-A), que reage com o sítio interno, isto é, a região do ácido poligalacturônico da protopectina e, protopectinase tipo B (PPase-B) que reage com o sítio externo, ou seja, com as cadeias de polissacarídeos que podem estar conectadas às cadeias de ácido poligalacturônico, constituintes das paredes celulares. Estas não são muito abundantes, e possuem pouco interesse industrial na degradação da pectina (Uenojo & Pastore, 2007).

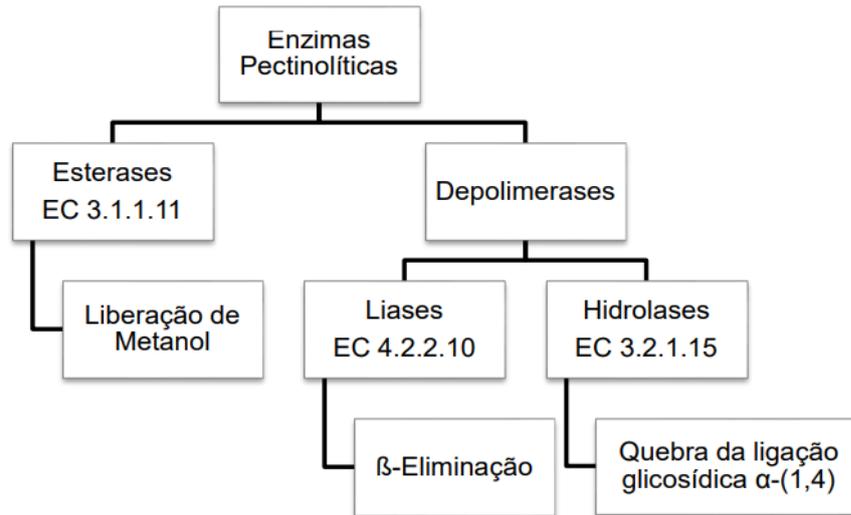
**Tabela 1.** Enzimas pectinolíticas que degradam as substâncias pécticas

TIPOS DE PECTINASES	EC	SUBSTRATO	MODO DE AÇÃO
Protopectinases tipo A	3.2.1.99	Protopectina	Degradam as protopectinas insolúveis do sítio interno, região do GalA, em pectina solúvel altamente polimerizada.
Protopectinases tipo B	3.2.1.99	Protopectina	Degradam as protopectinas insolúveis do sítio externo, quebrando as ligações de GalA com outros polissacarídeos presentes na parede, em pectina solúvel altamente polimerizada.
<b>Desesterificantes (Esterases)</b>			
Pectina metil esterases	3.1.1.11	Pectina	Catalisa a desesterificação dos grupos metoxila da pectina, produzindo ácido péctico (pectato) e metanol. $\text{Pectina} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Pectato} + \text{CH}_3\text{OH}$ Atua preferencialmente em um grupo de éster de metila da unidade galacturonana ao lado de um ácido galacturônico não esterificado.

Pectina acetil esterases	3.1.1.6	Pectina	Catalisam a desesterificação dos grupos acetila da pectina, tanto na porção HG quanto na RG, produzindo grupos acetila (de HG acetilada), oligogalacturonatos e RG em diferentes medidas.
<b>Despolimerizantes (Hidrolases e Liases)</b>			
<b>(A) HIDROLASES</b>			
(A-1) Endo-polimetilgalacturonase	3.2.1.15	Pectina	Catalisam a hidrólise por clivagem de ligações glicosídicas entre unidades de ácido poligalacturônico metoxilados na cadeia principal da pectina de forma aleatória.
(A-2) Exo-polimetilgalacturonase	3.2.1.67	Pectina	Catalisam a hidrólise por clivagem de ligações glicosídicas sucessivas entre unidades de ácido poligalacturônico metoxilados a partir da extremidade não-redutora.
(A-3) Endo-poligalacturonase	3.2.1.15	Ácido pécico	Catalisam a hidrólise aleatória das ligações glicosídicas entre unidades de ácido poligalacturônico não esterificados, produzindo vários oligômeros de ácido galacturônico.
(A-4) Exo-poligalacturonase (tipo I)	3.2.1.67	Ácido pécico	Catalisam a hidrólise das ligações sucessivas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não-redutora, liberando monômeros.
(A-4.1) Exo-poligalacturonase (tipo II)	3.2.1.82	Ácido pécico	Catalisam a hidrólise das ligações sucessivas do ácido poligalacturônico a partir da extremidade não-redutora, liberando dímeros.
<b>(B) LIASES</b>			
(B-1) Pectato liase (ou poligalacturonato liase, PGL) – endo	4.2.2.2	Ácido pécico	Rompe as ligações glicosídicas internas entre resíduos de ácido pécico por trans-eliminação. Requer $Ca^{2+}$ para atividade.
(B-2) Pectato liase (ou poligalacturonato liase, PGL) – exo	4.2.2.9	Ácido pécico	Rompe as ligações glicosídicas internas entre resíduos de ácido galacturônico por trans-eliminação, a partir de terminais não redutores.
(B-3) Pectina liase (ou polimetilgalacturonato liase, PMGL)	4.2.2.10	Pectina	Rompe as ligações glicosídicas mais ou menos esterificadas por trans-eliminação do hidrogênio que resulta na ligação insaturada entre C4 e C5. Também são subdivididas em endo e exo-PMGL.

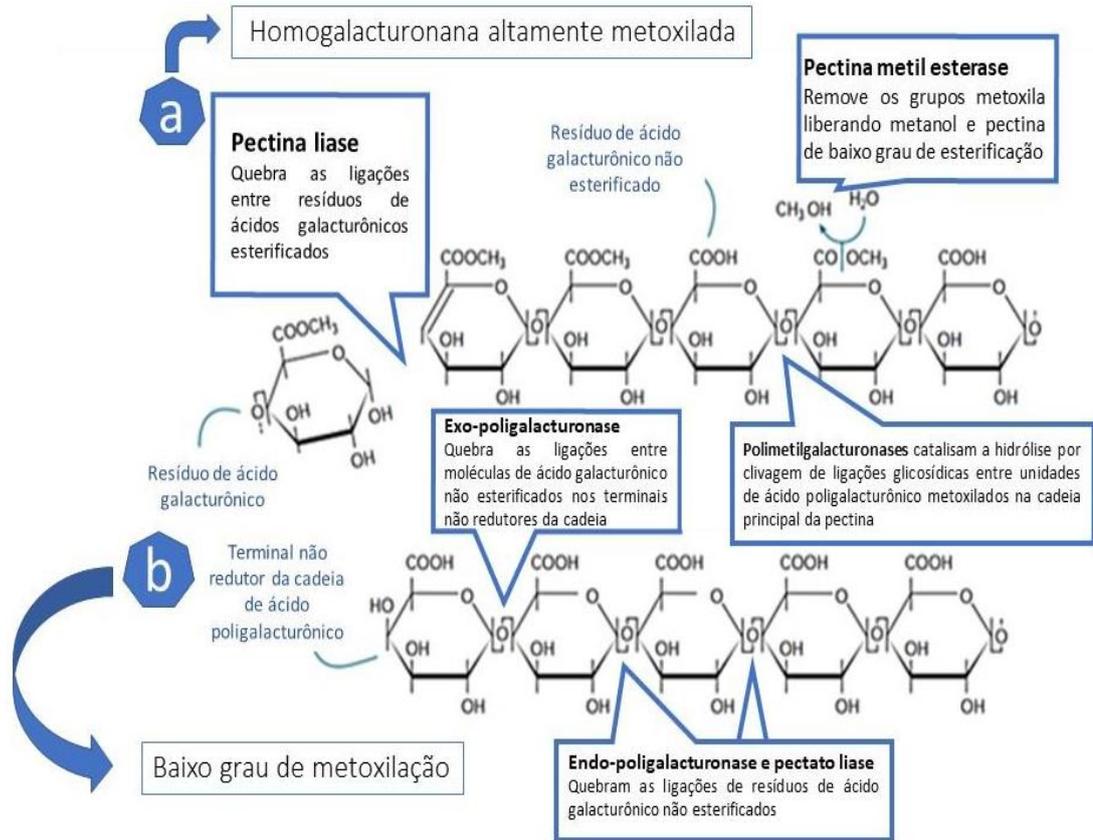
EC – Estas enzimas foram classificadas e nomeadas de acordo com a “Enzyme Commission” (EC), segundo as recomendações da IUPAC-IUB. (Fonte: Poletto, 2015; Infante, 2019; Suhaimi et al., 2021). Ilustração: Guimarães, N. C. A.

O papel das pectinases envolvidas na degradação das substâncias pécicas pode ser observado através da figura abaixo (**Figura 3**).



**Figura 3.** Divisão de funções das enzimas pectinolíticas (Fonte: Stock, 2013).

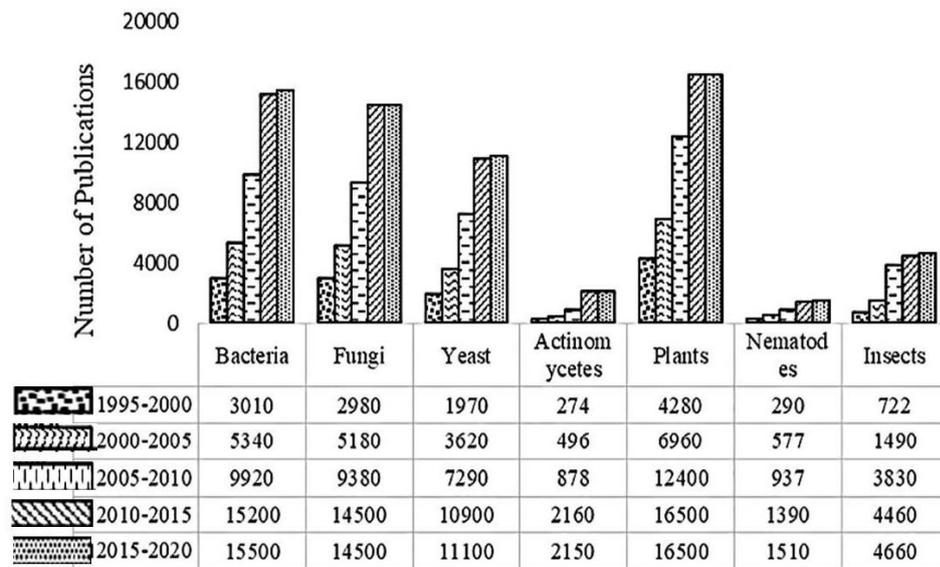
Algumas das enzimas pectinolíticas dependem da ação das demais pectinases para atuar devido às esterificações. Na **Figura 4** está representado o mecanismo de ação sequencial das pectinases. Primeiro a protopectinase torna a protopectina solúvel, transformando-se em pectina. Em seguida a pectina metil esterase remove os grupos metoxila da cadeia principal de homogalacturonana altamente metoxilada (representada pela letra ‘a’), reduzindo seu grau de esterificação. Isso possibilita que as poligalacturonases (PG) hidrolisem a cadeia de forma aleatória (endo-PG) ou a partir de seus terminais não redutores (exo-PG), pois essas enzimas atuam somente em substrato de baixo grau de metoxilação (representado pela letra ‘b’). A pectina liase rompe as ligações glicosídicas entre os resíduos de ácido galacturônico por trans-eliminação, sem sofrer interferência pela presença do grupo éster, o qual é responsável por aromas específicos dos sucos de frutas e pela liberação de metanol (Yadav et al., 2009). A pectina liase é a única pectinase capaz de atuar sem a ação das demais pectinases, independentemente do grau de esterificação da cadeia de pectina (Poletto, 2015).



**Figura 4.** Mecanismo sequencial de ação das enzimas pectinolíticas (Fonte: Adaptada de Poletto, 2015).

## 2.4. Organismos produtores de enzimas pectinolíticas

Enzimas pectinolíticas podem ser produzidas por diferentes fontes como plantas, nematóides, insetos e microrganismos. Na **Figura 5** estão algumas das diferentes fontes que vem sendo usadas para a produção de pectinases durante as últimas duas décadas na literatura. Considerando o total de publicações, bactérias e plantas representam cerca de 27% e 24%, respectivamente, atuando como as principais fontes para a produção de pectinase. No entanto, a partir de 2010, os estudos com fungos cresceram e atingiram 23% das publicações. Pesquisas sobre pectinases de actinomicetos e nematóides mostrando seu uso e papel na produção de enzimas corresponderam a apenas cerca de 5% das publicações (John et al., 2020).



**Figura 5.** Publicações de pesquisas na produção de pectinases de diferentes fontes nas últimas duas décadas (1995-2020) (John et al., 2020).

Embora existam diferentes fontes de produção de pectinases, as fontes mais proeminentes, que oferecem as melhores taxas de produtividade, são de origem microbiana. Além disso, as pectinases microbianas mostram uma ampla especificidade de substrato, versatilidade e capacidade de atuar sobre uma variedade de substâncias pécnicas, tornando-as biocatalisadores potenciais em vários processos industriais (John et al., 2020).

Além disso, os microrganismos são fontes ideais e atrativas para a produção de enzimas industriais devido a sua grande diversidade e disponibilidade, rápido crescimento, tempo curto de cultivo e possibilidade de manipulação genética. Cerca de 50% das pectinases são produzidas a partir de fungos (Garzon et al., 2021; Kaur et al., 2020; Rocha et al., 2020; Vaz et al., 2020; Zehra et al., 2020) e leveduras (Ezeh et al., 2023; Bezus et al., 2022; Haile & Kang, 2019), 35% de bactérias (Flores-Fernández et al., 2022; Shrestha et al., 2021; Tasgin et al., 2020; Murugan et al., 2020) e os 15% restantes são de origem vegetal ou animal (John et al., 2020).

#### 2.4.1. Pectinases microbianas

As pectinases produzidas pelas bactérias são geralmente de natureza alcalina, e têm desempenhado um papel importante nas preparações de enzimas comerciais, com amplas aplicações, principalmente no processamento têxtil, bio-limpeza de fibras de algodão, degomagem e maceração de culturas de fibras, e pré-tratamento de águas residuais pécnicas.

Entre a grande diversidade de gêneros bacterianos disponíveis para produção de enzimas, as do gênero *Bacillus* são as mais reportadas (Kavuthodi & Sebastian, 2018).

Diversos pesquisadores trabalhando com bactérias pectinolíticas são reportados na literatura: Flores-Fernández et al. (2022), por exemplo, clonaram e expressaram as pectinases de *Thermotoga maritima*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus licheniformis* (BLI09) e *Streptomyces ambofaciens* (SAM10) em *Escherichia coli* BL21, purificaram e caracterizaram completamente as enzimas obtidas com o objetivo de usá-las para bioconversão de pectina em ácido D-galacturônico; nos estudos de Shrestha et al. (2021) foi feita uma seleção e identificação molecular de novas bactérias pectinolíticas de solo de floresta; no trabalho de Murugan e colaboradores (2020) foram selecionadas bactérias produtoras de pectinases e realizado o estudo da melhor produtora, que foi uma espécie de *Bacillus* (FWS II-4); outro estudo, com *Acinetobacter calcoaceticus*, reportou a imobilização de uma pectina liase purificada e sua utilidade na indústria de alimentos (Tasgin et al., 2020); uma pectinase alcalina foi produzida por *Bacillus tequilensis* (Zhang et al., 2019); *Bacillus licheniformis* UNP-1 produziu uma pectinase termo-pH estável (Pathak & Jadhav, 2019); Torimiro et al. (2018) reportaram a produção de pectinases por *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella aerogenes* a partir de frutos em deterioração sob cultivo submerso; Oluoch et al. (2018) relataram o isolamento de muitos bacilos alcalifílicos de fontes termais, e verificou-se que suas enzimas eram estáveis em condições alcalinas extremas, tornando-se candidatas potenciais para aplicações em indústrias têxteis.

No entanto, a maior parcela de pectinases comerciais é produzida a partir de fungos, pois eles são um dos maiores grupos de eucariotos que são decompositores naturais de matéria orgânica. Devido às suas características de reprodução e crescimento, podem se adaptar a uma ampla gama de substratos, como a maioria dos materiais vegetais (de Lucas et al., 2020). Os resíduos agrícolas, como por exemplo, as cascas derivadas das frutas, podem ser utilizados pelos microrganismos como substratos durante os processos de cultivo para a produção de enzimas, que são utilizadas em diversos setores da indústria (Ezeh et al., 2023; Flores-Fernández et al., 2022; Garzon et al., 2021; Zehra et al., 2020; Silva et al., 2019a,b; Marzo et al., 2018; Ahmed et al., 2015; John et al., 2020).

Os secretomas de fungos são compostos por conjuntos de proteínas altamente dinâmicos, incluindo várias enzimas ativas em carboidratos, capazes de hidrolisar os polissacarídeos da biomassa vegetal em produtos de interesse biotecnológico, como açúcares fermentáveis (Cologna et al., 2018). Como resultado, os produtos de interesse podem ser produzidos com baixo custo, alto rendimento e baixa geração de resíduos, o que é denominado

biotecnologia amigável ao ambiente (de Lucas et al., 2020; Cologna et al., 2018; Chambergo & Valencia, 2016).

Dentre os principais fungos, os fungos filamentosos e os fungos termófilos são as fontes preferidas pelas indústrias, por apresentarem excelente capacidade de secreção extracelular de proteínas (diferente das enzimas de bactérias, que são intracelulares), com amplo espectro de ação, alta especificidade de substrato, alta estabilidade, segurança e sustentabilidade, além de uma maior velocidade de reação quando comparada aos processos industriais usuais que são caros e prejudiciais ao meio ambiente (Cologna et al., 2018; Chambergo & Valencia, 2016).

Dentre as várias espécies de fungos relatadas na literatura como produtoras de pectinases (Suhaimi et al., 2021), as do gênero *Aspergillus* sp. são as mais citadas, pois produzem compostos bioativos importantes economicamente, como as enzimas. Alguns exemplos são: *Aspergillus aculeatinus* (Garzon et al., 2021); *A. niger* (Ahmed et al., 2015; Mahmoodi et al., 2019; Kaur et al., 2020); *A. terreus* (Vaz et al., 2020); *A. fumigatus* MS16 (Zehra et al., 2020); *Aspergillus* sp. (Sudeep et al., 2020); *A. aculeatus* URM4953 (Silva et al., 2019a); *A. awamori* (Marzo et al., 2018); *A. japonicus* (Ferreira et al., 2018; Li et al., 2015a; Li et al., 2015b); *A. giganteus* (Ortiz et al., 2016); *A. niveus* (Maller et al., 2012); entre outros.

## 2.5. Estratégias para produção de pectinases

### 2.5.1. Cultivo em meio de baixo custo e tipo de meio de cultivo

Os métodos tradicionais para produção de enzimas são: cultivo submerso (SC - do inglês “*submerged cultivation*”) e cultivo em estado sólido (SSC - do inglês “*solid state cultivation*”). Na **Tabela 2** abaixo observa-se algumas das vantagens e desvantagens de cada um dos métodos.

**Tabela 2.** Comparação de SC e SSC do ponto de vista do processo “up”, “mid” e “downstream”

Características	SSC	SC
Microrganismo	Mais adequado para fungos	Mais adequado para isolados bacterianos
Proporção de inóculo	Grande	Baixa
Meio	Meio de baixo custo	Meio caro
Condição	Estática	Agitada

Distribuição de nutrientes	Não uniforme	Uniforme
Resistência entre partículas	Existe	Não existe
Controle de parâmetros	Difícil	Fácil
Suprimento de oxigênio	Por difusão	Por aeração
Utilização de água	Limitada	Ilimitada
Volume de reatores	Menor	Maior
Processamento “downstream”	Mais fácil	Requer muitos passos
Aumentar a escala	Difícil	Mais fácil
Contaminação	Menor chance	Mais propenso a contaminantes
Investimento de capital	Menor	Maior

*Fonte:* John et al., 2020.

Durante o cultivo, diferentes parâmetros como meio de crescimento, condições de cultivo, substrato, pH, temperatura, aeração, umidade, sais, fonte de nitrogênio, volume do inóculo, idade do inóculo, tipo de cepa e indutores são considerados para aumentar a produção de pectinase usando microrganismos (Amin et al., 2019).

A maioria das indústrias de fabricação de enzimas usa SC para produção, porque esse processo pode ser facilmente manipulado e a produção pode ser complementada quando houver necessidade (Oumer & Abate, 2018). Durante a SC, há uma mistura uniforme de nutrientes, melhor transferência de calor e massa, e uma melhor difusão dos microrganismos. Portanto, para a produção comercial de pectinase, a SC é geralmente usada. No entanto, devido a algumas desvantagens, a SC vem sendo substituída pela SSC. As culturas SC funcionam como sistemas homogêneos que requerem grandes gastos de energia para fornecer rápidas e altas demandas de oxigênio (John et al., 2020), possuem alto custo de ingredientes, baixo rendimento, necessidade de agente anti espuma e alta produção de efluentes, por isso são desvantajosas (Patidar et al., 2018).

O processo SSC tem a vantagem de ser estático, sem gastos de energia mecânica que permite a utilização de agro resíduos de baixo custo como substrato para o crescimento do microrganismo. Além disso, os produtos de cultivos em estado sólido possuem melhor qualidade e características melhoradas em comparação com os produtos obtidos em SC. Outras vantagens são: possuem processamento “downstream” direto, necessitam menos de entrada de

energia, é uma prática verde e sustentável, com hiperprodução de metabólitos microbianos (Amin et al., 2019).

Para descobrir um substrato econômico e adequado para a produção de pectinases, diferentes resíduos agrícolas/agroindustriais e substratos alternativos de baixo custo vem sendo estudados usando SSC, como cascas e bagaços de frutas, farelo de trigo, sabugo de milho, palha de arroz, bagaço de laranja, bagaço de cana, etc. Pouca água é adicionada ao substrato sólido em SSC para que os microrganismos, principalmente fungos, cresçam como em seu habitat natural e produzam o máximo de pectinase. Os microrganismos obtêm nutrientes suficientes do substrato adicionado e não há necessidade de nutrientes extras na SSC (John et al., 2020). Além disso, as enzimas produzidas em SSC possuem resistência adequada contra a repressão catabólica, representando uma tecnologia adequada para a produção de enzimas comerciais, fato que pode ser notado pelo aumento dos estudos na literatura nas últimas décadas (Mahmoodi et al., 2019).

Algumas das pectinases produzidas por microrganismos usando resíduos como substrato em SC e SSC reportadas na literatura são: *Yarrowia phangngaensis* usando casca de banana em SC (Ezeh et al., 2023); *Calonectria pteridis* usando farelo de trigo e eucalipto em SC (Ázar et al., 2020); *A. niger* usando farelo de trigo em SC (Kaur et al., 2020); *A. aculeatus* URM4953 com casca de maracujá (Silva et al., 2019a); *A. japonicus* em bagaço de cana de açúcar (Ferreira et al., 2018); *A. niger* com resíduo de casca de laranja (Ahmed et al., 2015); co-cultivo de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* com bagaço de maçã (Kuvvet et al., 2019); *A. fumigatus* MS16 usando cascas de banana em SSC (Zehra et al., 2020); *A. niger* com bagaço de laranja e bagaço de cana-de-açúcar (Mahmoodi et al., 2019); *A. awamori* com casca de laranja (Marzo et al., 2018); *A. giganteus* em uma mistura de farelo de trigo, casca de laranja e limão (Ortiz et al., 2016); *A. japonicus* com pó de casca de laranja e farelo de trigo em SC e SSC (Li et al., 2015b); *A. niveus* com farelo de trigo e casca de maçã (Maller et al., 2012) e com casca de limão (Maller et al., 2011); *A. awamori* com bagaço de uva (Díaz et al., 2011); e a pectinase do *A. japonicus* do presente estudo que foi produzida com casca de maracujá em SSC (Cavaliere de Alencar Guimarães et al., 2022).

Um estudo que mostrou a grande diferença entre a produção de pectinases em SC e SSC por *A. niveus* foi realizado por Maller et al. (2011), onde a produção de poligalacturonase usando palha de arroz como substrato foi 9,1 vezes maior em meio sólido do que em meio líquido, seguida por casca de limão e farelo de trigo (4,4 vezes), espiga de milho (3,9 vezes), casca de maracujá (3,1 vezes), bagaço de cana (2,9 vezes), casca de laranja (1,5 vezes) e casca de maçã (1,3 vezes).

### 2.5.2. Determinação dos parâmetros bioquímicos para aplicação das pectinases

Além da padronização do melhor meio de cultivo para produção, as características bioquímicas das pectinases, como temperatura de atuação e as faixas de pH, as estabilidades quando submetidas a altas temperaturas, ou armazenadas em baixas temperaturas, ou temperatura ambiente, são de suma importância para determinar suas possíveis aplicações. Isso porque as condições de processamento na indústria, como o emprego de elevadas temperaturas, e diferentes pHs durante as diferentes etapas da produção, podem tornar as enzimas instáveis e totalmente inativas durante o processo. Sendo assim, o estudo da otimização e/ou maximização da produção e atividade de pectinases microbianas a partir de microrganismos é de grande valia (Zeni, 2011).

A maioria das pectinases termoestáveis é produzida por bactérias, por exemplo a pectinase de *Paenibacillus xylanolyticus* que apresenta temperatura ótima de 60-70 °C (Giacobbe et al., 2014) e *Bacillus* sp. MG-cp-2 com temperatura ótima de 60 °C (Kapoor et al., 2001). Entretanto, alguns trabalhos de pectinases fúngicas termotolerantes também têm sido reportados, como em um estudo de produção de pectinase por *A. fumigatus* MS16 onde foi observado que a atividade da pectinase produzida exibiu atividade ótima a 60 °C (Zehra et al., 2020), assim como as poligalacturonases de *R. pusillus* (Trindade et al., 2016) e uma poligalacturonase produzida por *T. aurantiacus* (Martins et al., 2012).

Apesar dos extratos brutos serem úteis para alguns setores industriais devido a presença de várias enzimas juntas, para uma melhor caracterização, é interessante ter a enzima pura. Assume-se que o extrato bruto extracelular contém somente proteínas, mas, várias outras biomoléculas estão presentes, como, por exemplo, DNA, RNA, carboidratos, lipídeos, além de vários outros metabólitos. Pequenas moléculas em geral são removidas por diálise ou cromatografia baseada em tamanho (exemplo, cromatografia de exclusão por tamanho, também conhecido como filtração em gel) e, portanto, são fáceis de separar. Contudo, uma atenção especial deve ser dada à separação de macromoléculas, como os ácidos nucleicos e polissacarídeos devido às características únicas de cada molécula que demandam estratégias diferenciadas para separá-las (John et al., 2020).

A purificação de enzimas é realizada por meio de etapas sequenciais para obtenção de enzimas puras que podem ser utilizadas para diversas aplicações industriais. Tal purificação e caracterização bioquímica ajudam a compreender completamente suas propriedades e características. A seleção da estratégia de purificação é baseada na aplicação da enzima. As enzimas de alta qualidade, em baixa quantidade (amostra pura), são usadas em aplicações

diagnósticas e terapêuticas, enquanto alta quantidade em baixa qualidade (amostra bruta) são necessárias para outras aplicações industriais. Durante esses processos de purificação, muitas outras enzimas ou compostos produzidos pelo mesmo organismo podem interferir no processo de separação e, portanto, a seleção cuidadosa da estratégia de purificação deve ser seguida para obter enzimas de maior pureza e rendimento (John et al., 2020).

Outro método usado para melhorar suas propriedades e aplicação, é através da imobilização enzimática, uma vez que se tem a recuperação das pectinases com uso contínuo da enzima em processos industriais (de Oliveira et al., 2018). Esse processo consiste no confinamento da molécula em certa região definida de uma matriz, mantendo a maior parte de sua atividade catalítica inicial preservada (Hakimzadeh & Sadeghi, 2017). Além disso, a imobilização pode fornecer muitas vantagens tais como o armazenamento a longo prazo, contaminação minimizada do produto, fácil separação de produtos (recuperação), melhora da estabilidade enzimática, menor inibição, e reutilização das enzimas, tornando os processos mais produtivos, menos dispendiosos e competitivos em relação aos métodos químicos tradicionais (Muller et al., 2022; John et al., 2020; Vaz et al., 2020).

Enzimas e células inteiras são imobilizadas usando vários métodos, como: aprisionamento ou encapsulamento em membrana polimérica, adsorção física em materiais hidrofóbicos e resinas de troca iônica, ligação covalente em matriz insolúvel e reticulação, e são reportadas por diversos estudos na literatura (Ozyilmaz & Gunay, 2022; Ejaz et al., 2020; Hosseini et al., 2021; Sanchez et al., 2015).

Um dos métodos mais baratos é a imobilização em alginato de cálcio, e para isso utiliza-se o alginato de sódio, que tem sido relatado como um suporte eficaz para a imobilização de enzimas devido à biocompatibilidade, baixo custo, fácil disponibilidade e resistência à contaminação microbiana em comparação com outros suportes (de Oliveira et al., 2018). Diversos estudos têm sido empregados na imobilização de enzimas usando alginato. De Oliveira et al. (2018) imobilizaram pectinase de *Aspergillus aculeatus* para aplicação no clareamento de sucos de maçã e umbu; Bibi et al. (2015) imobilizaram uma endo-xilanase de *Geobacillus stearothermophilus*; Nawaz et al. (2015) imobilizaram uma maltase de *Bacillus licheniformis*; a imobilização de células inteiras de *Aspergillus niger* em diferentes sistemas de alginato para a produção de poligalacturonase foi estudada por Nighojkar et al. (2006) e verificou-se que a produção de pectinase foi maior com 3% de alginato e 1,5% de casca de laranja como indutor.

## **2.6. Aplicação industrial das pectinases**

As pectinases são economicamente muito importantes, pois possuem inúmeras aplicações na indústria têxtil, farmacêutica, de ração animal, detergente e papel, onde são mais utilizadas pectinases alcalinas produzidas por bactérias (Kuvvet et al., 2019). Na indústria de alimentos, as pectinases possuem várias aplicações tais como na fabricação de purês de frutas, mantendo a textura de pedaços de frutas para posterior adição em outros produtos, inibindo a formação de espuma nas fermentações de chá e café, auxiliando na extração de óleo vegetal como óleos de canola, semente de girassol, palma e azeitona onde substituem o uso do hexano, potencial agente carcinogênico, e no tratamento de águas residuárias contendo material pectínico, entre outras (Aboagye et al., 2017; Ortiz et al., 2016; Mahesh et al., 2016; Resende et al., 2004). E nas indústrias de sucos auxiliam na redução da viscosidade da polpa de fruta melhorando, por sua vez, a extração, a filtração e a clarificação de sucos.

### **2.6.1. Aplicação das pectinases nas indústrias de sucos de frutas**

A aplicação de pectinases nas indústrias de sucos de frutas reduz o custo, aumentando o rendimento dos produtos, e é mais competitiva do que os outros diferentes processos estabelecidos. Além disso, o uso de enzimas representa um método alternativo simples e mais sustentável para diversificar a produção, principalmente em suco de frutas tropicais (que possuem mais pectina e são polpudos), aumentando a participação das mesmas no mercado (Tapre & Jain, 2014).

A abundância de polissacarídeos como pectina e amido na fruta gera sucos de frutas turvos e viscosos. No entanto, o suplemento de pectinases quebra a pectina e induz a precipitação de agregados e proteínas, que podem ser removidos por filtração ou centrifugação, aumentando o rendimento do suco (Ezeh et al., 2023). Além disso, as pectinases diminuem a capacidade de retenção de água da pectina e reduzem a viscosidade e a turbidez (Tapre & Jain, 2014; Nighojkar et al., 2019; Shrestha et al., 2021), além de reduzir o tempo de filtração em até 50% (Dal Magro et al., 2019). Assim, as indústrias de sucos de frutas usam pectinases e outras enzimas que degradam a parede celular, como celulases e proteases, para amolecer as frutas, facilitar a extração, aumentar o rendimento, estabilizar e clarificar o suco (Patidar et al., 2018; Nighojkar et al., 2019).

Durante o processamento de frutas, várias etapas são realizadas em temperaturas elevadas, e para a hidrólise enzimática, torna-se necessário o resfriamento do material, gerando

gastos (energia e água), devido à baixa estabilidade térmica das preparações de pectinases comerciais. Assim, a utilização de pectinases termoestáveis poderia diminuir o tempo e o custo do processo (Gomes et al., 2007).

Outro fator importante é o pH, pois a maioria das frutas tem pHs ácidos. Neste contexto, os fungos e as leveduras se tornam interessantes pois produzem principalmente pectinases acídicas, e por isso suas enzimas são muito usadas nas indústrias de sucos de frutas e produção de vinho (Kohli & Gupta, 2015).

Vários estudos da ação de pectinases produzidas por microrganismos em sucos de frutas são reportados na literatura, avaliando viscosidade, turbidez, rendimento e clarificação dos sucos com diferentes metodologias. O trabalho de Ezeh et al. (2023) reportou a clarificação de suco de maçã onde a pectinase de *Yarrowia phangngaensis* gerou percentuais de redução de turbidez e claridade de 39,33% e 59,84%, respectivamente; os estudos de Gani et al. (2021) mostraram uma variação entre 38,80% e 91,10% de clarificação em suco de pera, cujas condições ótimas de processamento para extração assistida por pectinase foram concentração de 1,90% da enzima, temperatura de 30 °C e tempo de incubação de 120 min; estudos de Sandri & Silveira (2018) reportaram um tratamento enzimático de suco de morango com a pectinase de *A. niger* que reduziu 60% dos níveis de turbidez e 40% na viscosidade das amostras tratadas; a pectinase imobilizada de *A. aculeatus* usada na clarificação do suco de maçã mostrou uma diminuição da absorbância de 97,22% e de umbu 45,52% (de Oliveira et al., 2018); nos estudos de Sethi et al. (2016), o uso da pectinase produzida por *Aspergillus terreus* na clarificação de suco de maçã resultou em 80% de clarificação após incubação por cerca de 30 min; estudos de Rocha e colaboradores (2020) obtiveram 36% de clarificação do suco de cajá usando extrato bruto de *A. niger* IOC 4003 incubado com pectinase.

As poligalacturonases são as pectinases mais reportadas na literatura em diversos tipos de estudos, segue alguns exemplos das que foram reportadas para aplicação em sucos de frutas: estudos de Anand et al. (2017) com uma poligalacturonase ácida produzida por *Aspergillus niger*, onde o resultado obtido foi um aumento de 27% na transmitância observada no suco de laranja clarificado; a clarificação de suco de maçã com a poligalacturonase purificada de *Calonectria pteridis*, que gerou um aumento no volume e na quantidade de açúcares redutores liberados de 10,65% e 40,93%, respectivamente (Ázar et al., 2020); e uma endopoligalacturonase ácida de *Penicillium oxalicum* que aumentou em 29,5% a transmitância da polpa de mamão (Cheng et al., 2016).

## 2.7. Fungos utilizados no estudo: *Aspergillus japonicus* e *Thermoascus aurantiacus*

### 2.7.1. *Aspergillus japonicus*

Esta espécie foi sequenciada como parte do projeto de sequenciamento de todo o gênero *Aspergillus* - um projeto dedicado a realizar o sequenciamento de todo o genoma de todos os membros do gênero *Aspergillus*. O *Aspergilli* é um gênero ubíquo e rico em espécies, contendo atualmente mais de 300 fungos filamentosos. O gênero abrange uma ampla gama de fenótipos e tem uma pegada econômica substancial, pois inclui fermentadores de alimentos, fábricas de células-chave para a produção de enzimas e ácidos orgânicos, patógenos de plantas, organismos modelo para biologia celular, patógenos humanos oportunistas, produtores de animais e micotoxinas humanas e degradadores de uma ampla gama de biomassa orgânica relevante para a conversão de bioenergia (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Aspjap1/Aspjap1.home.html>).

*Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* (**Figura 6**) é um fungo pertencente à família Trichocomaceae (Nadumane et al., 2016). O fungo *Aspergillus japonicus* Saito, é membro do gênero *Aspergillus* seção Nigri (formalmente grupo dos *Aspergillus niger*) e é distribuído por todo mundo, crescendo em uma vasta variedade de substratos. Devido a sua importância biotecnológica, a identificação das linhagens precisa ser clara, pois as diferenças entre as espécies são muito sutis (Pasin, 2015).

É uma espécie de *Aspergillus* que produz colônias pretas com micélio branco, denso e basal e com ausência de exudato e pigmentos solúveis. São quase completamente cobertos por conídios de coloração preta ou marrom escura, com formato redondo e, ocasionalmente elíptico além de uniseriados. Tem sido isolada de solos, raízes de plantas e folhas em decomposição, predominantemente em regiões tropicais e subtropicais (Klich e Pitt, 1988). Cresce rapidamente a temperatura ambiente (24-28°C), possuindo colônias com cerca de 5,0 a 6,0 cm de diâmetro durante 4 dias de incubação em meio sólido.



**Figura 6.** *Aspergillus japonicus* crescido em tubos contendo A) meio sólido (BDA) e B) meio líquido (SR), e C) imagem dos conidióforos (100x) de *A. japonicus* Saito. Microcultivo em BDA (batata-dextrose-agar) a 30 °C.

Cepa isolada em solo da Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande/MS-Brasil. Fotografias: N.C.A., Guimarães e C.R., Marchetti.

### 2.7.2. *Thermoascus aurantiacus*

A cepa de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 (**Figura 7A e 7B**) usada neste estudo foi acessada da Micoteca do Laboratório de Bioquímica da UNESP de São José do Rio Preto/SP, o qual foi isolado de material hemicelulósico em decomposição coletado no estado do Amazonas, Brasil.

*Thermoascus aurantiacus* é um fungo termofílico em Eurotiales que foi examinado extensivamente por sua capacidade de secretar grandes quantidades de enzimas termoestáveis para a despolimerização de celulose e hemicelulose da biomassa vegetal (McClendon et al., 2012). O sequenciamento de *T. aurantiacus* fornecerá informações importantes sobre a expressão dessas importantes enzimas desconstrutoras de polissacarídeos e permitirá que *T. aurantiacus* seja usado como plataforma para a produção de enzimas termofílicas. Ele produz uma colônia espessa, crocante e marrom-dourada em ágar (**Figura 7C**). A aparência crostosa deve-se à presença de muitos cleistotécios (ascocarpos fechados) que contêm ascos. Dentro de cada asco há um aglomerado de 8 ascósporos, mostrados em diferentes estágios de maturidade (canto inferior direito da figura 7C). De FUNGAL BIOLOGY: A Textbook por JIM DEACON Blackwell Publishing 2005. Cortesia de Jim Deacon, The University of Edinburgh (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Theau2/Theau2.home.html>).



**Figura 7.** *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 crescido (A) em placa e (B) tubo contendo meio sólido (BDA) a 40 °C. A cepa de *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756 usada neste estudo foi acessada da Micoteca do Laboratório de Bioquímica da UNESP de São José do Rio Preto/SP, o qual foi isolado de material hemicelulósico em decomposição coletado no estado do Amazonas, Brasil. Fotografias A e B: N.C.A., Guimarães e C.R., Marchetti, C) Fonte: site <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Theau2/Theau2.home.html>.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a produção de pectinases pelos fungos *Aspergillus japonicus* e *Thermoascus aurantiacus* usando substratos de baixo custo e analisar as suas aplicações na clarificação de sucos de frutas.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Avaliar as condições ótimas para produção das pectinases usando 21 fontes de carbono de baixo custo: casca de laranja, bagaço de laranja, casca de maracujá, casca extrusada de laranja, erva-mate fina de chimarrão, erva-mate de tereré média fina, erva-mate de tereré grossa, erva-mate fina de chimarrão usada, erva-mate de tereré média fina usada, erva-mate de tereré grossa usada, farinha de mandioca de Furnas do Dionísio/MS, farinha de mandioca de Rondonópolis/MT, farinha de mandioca grossa do Pará, farinha de mandioca grossa Cuiabana/MT, farinha de milho, farinha de mandioca grossa Cruzeiro do Sul/Acre, farelo de trigo, glicose, bagaço de cana explodido, palha de milho e farinha de soja; e diferentes tempos de crescimento (24 – 192 h);
- ii) Avaliar o melhor pH e temperatura para atividade da enzima;
- iii) Purificar as pectinases de *A. japonicus* e *T. aurantiacus* por técnicas cromatográficas associadas (troca iônica, interação hidrofóbica e/ou exclusão molecular);
- iv) Analisar a pectinase semi-purificada de *A. japonicus* por eletroforese (SDS-PAGE, PAGE e zimograma) e por cromatografia líquida com espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS);
- v) Caracterizar a pectinase semi-purificada de *A. japonicus* (temperatura, pH, estabilidade a temperatura e pH, especificidade);
- vi) Imobilizar a pectinase semi-purificada de *A. japonicus* em diferentes concentrações de alginato de sódio (1 – 4,5%) e cloreto de cálcio (0,03 – 0,8 M), e avaliar o reuso da enzima imobilizada;
- vii) Aplicar a pectinase (extrato bruto e semi-purificada) de *A. japonicus* nos processos de clarificação de sucos de frutas;

Extrato bruto – 13 frutas: maçã (Argentina), maçã (Europa), maçã (Grandsmith), banana da terra, banana nanica, manga (Haden), manga (Palmer), manga (Tommy), pêsego, pera (D’Anjou), pera (Portuguesa), pera (“red”) e goiaba branca;

Semi-purificada – 13 frutas: acerola, banana nanica, goiaba branca, guavira, pera, maçã gala, mamão, manga (Palmer), manga (Tommy), melão, ponkan, uva ísis e uva vitória;

- viii) Avaliar os efeitos do tempo de tratamento e da concentração de pectinase de *A. japonicus* na clarificação de suco de manga (Palmer);
- ix) Analisar a degradação da pectina presente no suco de manga (Palmer) pela pectinase de *A. japonicus* através de microscopia óptica.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Microrganismos e manutenção de crescimento

Neste estudo foram utilizados os fungos filamentosos *Aspergillus japonicus* UFMS 48.136 e *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756. O fungo *A. japonicus* foi coletado e isolado do solo da Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande/MS-Brasil.

O fungo termofílico *T. aurantiacus* foi cedido pelo Prof. Dr. Roberto Ruller, acessado da Micoteca do Laboratório de Bioquímica da UNESP de São José do Rio Preto/SP, o qual foi isolado de material hemicelulósico em decomposição coletado no estado do Amazonas, Brasil (Martins et al., 2007).

Para a manutenção das cepas foram feitos repiques em batata-dextrose-ágar inclinado (BDA) e o crescimento de *A. japonicus* e do *T. aurantiacus* foram realizados em estufas a 35 e 40 °C, respectivamente, por um período de 4-10 dias, sendo então mantidos na geladeira por no máximo 30 dias.

### 4.2. Produção de pectinase em cultivo submerso (SC) e cultivo em estado sólido (SSC) usando diferentes substratos

Para a produção da pectinase extracelular em cultivo submerso (SC, do inglês “*submerged cultivation*”), os fungos cresceram inicialmente em meio líquido segundo Rizzatti - SR (Rizzatti et al., 2001) modificado, contendo:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,1%),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,4%), peptona (0,2%), extrato de levedura (0,025%),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,05%), KCl (0,05%),  $\text{NaNO}_3$  (0,5%),  $\text{CaCl}_2$  (0,0003%),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,00035%),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,0004%) e tween 80 (0,1%), em 100 mL de água destilada, pH 6, junto com 1% dos diferentes substratos alternativos de baixo custo.

Foram usados 21 substratos alternativos de baixo custo (resíduos/produtos agroindustriais) para produção da pectinase em SC e SSC: casca de laranja em pó (1-CL); bagaço de laranja em pó (2-BL); casca de maracujá em pó (3-CM); casca extrusada de laranja (4-CEL); erva-mate fina de chimarrão (5-EMFC); erva-mate de tereré média fina (6-EMTMF); erva-mate de tereré grossa (7-EMTG); erva-mate fina de chimarrão usada (8-EM5US); erva-mate de tereré média fina usada (9-EM6US); erva-mate de tereré grossa usada (10-EM7US); farinha de mandioca de Furnas do Dionísio/MS (11-FFD); farinha de mandioca de

Rondonópolis/MT (12-FR); farinha de mandioca grossa do Pará (13-FGP); farinha de mandioca grossa Cuiabana/MT (14-FGC); farinha de milho (15-FM); farinha de mandioca grossa Cruzeiro do Sul/Acre (16-FGCSA); farelo de trigo (17-FT); glicose (18-G); bagaço de cana explodido (19-BCE); palha de milho (20-PMi) e farinha de soja (21-FS).

Os substratos foram comprados no mercado municipal de Campo Grande/MS, exceto a casca de maracujá e a casca extrusada de laranja que foram compradas em mercados de Ribeirão Preto/SP. A casca de laranja e o bagaço de laranja, e a farinha de soja, foram triturados em liquidificador no próprio laboratório; e as ervas usadas foram preparadas conforme usam aqui na região (consumidas/lavadas com água gelada para as ervas de tereré e água quente para as ervas de chimarrão).

O inóculo em cultivo submerso foi feito usando  $1 \times 10^6$  esporos/mL dos fungos, suspensos em 1 mL de água destilada. Um volume de 250  $\mu$ L dessa suspensão foi adicionado em frascos Erlenmeyer de 25 mL contendo 5 mL de meio de cultivo SR para o crescimento estacionário e, 500  $\mu$ L em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultivo, sob agitação (110 rpm) durante 96 h, à 35 °C para *A. japonicus* e 40 °C para *T. aurantiacus*. Após o crescimento em SC as culturas foram filtradas em bomba de vácuo com papel filtro (Whatman n° 1) para obtenção do extrato bruto contendo a pectinase extracelular.

A produção em meio sólido – cultivo em estado sólido (SSC, do inglês “*solid state cultivation*”), foi segundo metodologia de Martins et al. (2012), onde os fungos cresceram em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 5 g dos substratos, juntamente com 10 mL de solução de sais ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1% e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,1%). O inóculo foi feito usando os esporos dos fungos que foram ressuspensos usando essa mistura de 10 mL de solução de sais, posteriormente incubados em estufas à 35 °C para *A. japonicus* e 40 °C para *T. aurantiacus* durante 120 h. Após o crescimento, as culturas foram ressuspensas com 50 mL de água destilada, agitadas por 30 min, filtradas em peneiras, centrifugadas a 10.000 g durante 10 min a 4 °C, e o sobrenadante coletado foi considerado o extrato bruto contendo as enzimas de interesse nesse estudo.

#### **4.3. Efeito do tempo de crescimento para produção de pectinase**

Para avaliar o efeito do tempo de crescimento na produção de pectinase, foram selecionados os substratos que induziram as maiores produções. Para *A. japonicus* foi pré-selecionada a casca de maracujá como substrato, sendo o crescimento realizado a 35 °C por um

período de 24 a 192 h sob agitação e condição estacionária em SC, e somente estacionário em SSC.

Para *T. aurantiacus* foi usado SSC pré-avaliado, por um período de 24 a 192 h, sob condição estacionária, a 40 °C, usando farinha de mandioca de Rondonópolis/MT como substrato pré-selecionado.

A cada 24 h de crescimento, alíquotas foram retiradas e foi realizada a dosagem da atividade enzimática e proteica conforme item 4.4.

#### **4.4. Ensaio enzimático e proteico**

A determinação da atividade da pectinase de *A. japonicus* e *T. aurantiacus* foi realizada incubando 500 µl de enzima (diluída em água conforme necessidade de ajuste das absorbâncias) com 500 µl de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 contendo pectina citrus 1% (Sigma, P 3195) como substrato, a 45 e 50 °C, respectivamente. Em intervalos de 5, 10 e 20 min, a reação foi interrompida com 200 µl de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (1:1) utilizando ácido galacturônico como padrão. Após todos os tempos de reação as amostras foram fervidas durante 5 min, em seguida adicionado 2 mL de água destilada e feita a leitura de 200µl em microplaca a 540 nm, conforme metodologia de Miller (1959).

Para a pectinase imobilizada a dosagem foi adaptada. Foi realizada incubando as esferas obtidas (contendo 250 µl de enzima + 250 µl de alginato de sódio), 2 mL de água destilada e 2,5 mL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0, contendo pectina citrus 1% como substrato a 50 °C. No controle foi usado 250 µl de enzima livre + 250 µl de água destilada. Em intervalos de 15 e 30 min, a reação foi interrompida com 1 mL de DNS (1:1) utilizando ácido galacturônico como padrão. Após todos os tempos de reação as amostras foram fervidas durante 5 min, em seguida adicionado 8 mL de água destilada e feita a leitura de 200µl em microplaca a 540 nm, conforme metodologia de Miller (1959).

Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido galacturônico por min, nas condições do ensaio. Para o meio líquido a atividade foi expressa em U/mL e para a dosagem das atividades em meio sólido, a atividade foi expressa em U/g de substrato seco, que é calculada multiplicando as U/mL pela diluição com água no momento da extração da enzima do meio de cultivo (neste caso, multiplicado por 10).

A dosagem de proteína foi feita segundo o método de Lowry et al. (1951) utilizando-se soro albumina bovina (0,2 mg/mL) como padrão. As amostras (25µl, 50µl, 100µl ou 200 µl)

foram incubadas com água destilada fechando um volume final de 200  $\mu$ l. Em seguida, foi adicionado nesta mistura 1 mL do reagente ABC. Após 15 min de incubação foi acrescentado 100  $\mu$ l de Folin-Ciocalteu 2N em cada um dos tubos. E após 30 min foi feita a leitura de 200  $\mu$ l das misturas de incubação em leitora de microplacas a 660 nm. A mistura ABC foi composta de: A) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% + NaOH 0,1N; B) Tartarato de sódio e potássio 1% (p/v); C) CuSO<sub>4</sub> 1% (p/v), misturados no momento da dosagem das proteínas na proporção de 1 mL de A: 0,01 mL de B: 0,01 mL de C).

A atividade específica foi definida em Unidades por miligrama de proteína (U/mg de ptn).

## **4.5. Caracterização enzimática**

### **4.5.1. Efeito do pH na atividade da pectinase**

O pH ótimo para atividade da pectinase de *A. japonicus* e *T. aurantiacus* foi determinado a 45 e 50 °C, respectivamente, incubando a enzima com tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0 - 5,5; tampão Hepes 100 mM pH 7,0 - 8,0; tampão Tris.HCl 100 mM pH 8,0 – 9,0; e tampão McIlvaine pH 3,0 – 7,0 (McIlvaine, 1921), contendo pectina citrus 1% como substrato.

### **4.5.2. Efeito da temperatura na atividade da pectinase**

A temperatura ótima de *A. japonicus* e *T. aurantiacus* foi determinada incubando a pectinase em temperaturas variando de 35-70 °C e 40-75 °C, respectivamente, nos tampões e pHs ótimos de cada um. As atividades relativas foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima.

### **4.5.3. Efeito do pH na estabilidade da pectinase**

Para avaliar o efeito do pH na estabilidade da pectinase (extrato bruto), 100  $\mu$ L da pectinase foi incubado com 50  $\mu$ L de tampão McIlvaine na faixa de pH de 3,0 - 6,0 por um período de 24 h em banho de gelo. Alíquotas foram retiradas após 1, 2, 4 e 24 h, e em seguida foram dosadas conforme o item 4.4.

A atividade foi expressa como atividade residual, sendo que o valor de 100% correspondeu à atividade realizada em pH e temperatura ótima da enzima.

#### 4.5.4. Efeito da temperatura na estabilidade da pectinase

A estabilidade enzimática da pectinase (extrato bruto) foi avaliada na bancada (cerca de 25 °C), e em banho-maria a 50 e 55 °C, em diferentes tempos de incubação: 10, 20, 40, 60, 120, 240 e 360 min. Posteriormente, alíquotas de 100 µL de amostra foram retiradas e então o ensaio enzimático foi realizado conforme o item 4.4.

A atividade foi expressa como atividade residual, sendo que o valor de 100% correspondeu à atividade realizada em pH e temperatura ótima da enzima.

#### 4.6. Purificação enzimática

O extrato bruto de *A. japonicus* (100 mL) foi dialisado em água destilada, e o volume obtido (102 mL) foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-fractogel (2,0 x 11,0 cm) previamente equilibrada com tampão Tris.HCl, 10 mM, pH 8,0. As proteínas foram eluídas com gradiente de cloreto de sódio 0 - 1 M no mesmo tampão. Frações de 3,6 mL foram coletadas e aquelas que apresentaram atividade enzimática foram reunidas e dialisadas em água destilada. Posteriormente, a amostra proveniente da coluna (pico 2) foi equilibrada com tampão Tris.HCl, 10 mM, pH 8,0, contendo 1 M de sulfato de amônio e um volume de 81 mL foi submetido à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna fenil-sepharose CL-4B (2,0 x 8,5 cm) previamente equilibrada no mesmo tampão. As proteínas foram eluídas gerando um pico de 200 mL, que foi então reunido e dialisado em água destilada para posterior caracterização.

Para purificação da pectinase de *T. aurantiacus*, um volume de 49 mL de extrato bruto dialisado em água destilada foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-fractogel (2,0 x 11,0 cm) previamente equilibrada com tampão Tris.HCl, 10 mM, pH 8,0. As proteínas foram eluídas com gradiente de cloreto de sódio 0 - 2 M no mesmo tampão. Frações de 3,6 mL foram coletadas e aquelas que apresentaram atividade da pectinase foram reunidas e dialisadas em água destilada. Posteriormente, a amostra proveniente da coluna de troca iônica (pico 2 com um volume de 31 mL) foi equilibrada usando diálise em tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,0, contendo 150 mM de cloreto de sódio e um volume de 22 mL obtido foi submetido à cromatografia de gel filtração em coluna Sephacryl S-200 (1,0 x 86,0 cm) previamente equilibrada no mesmo tampão. As proteínas foram eluídas (3,2 mL) com o mesmo tampão e as frações contendo atividade pectinolítica foram reunidas e dialisadas em água destilada gerando um volume final de 29 mL, o qual foi usada nos processos de caracterização enzimática.

A tabela de purificação é construída através de cálculos baseados nos volumes das amostras (V), unidades totais de atividade enzimática (UT), miligrama de proteínas totais (PTN), atividade específica (AE - U/mg de proteína), rendimento (%) e fator de purificação (P) após as etapas de purificação.

As unidades totais são as U/mL multiplicadas pelo volume total de amostra; o rendimento (%) é uma porcentagem de atividade enzimática calculada pela relação entre a atividade enzimática em unidades totais obtida após cada etapa das colunas e as unidades totais do controle (extrato bruto) multiplicada por 100:

$$\% \text{ rendimento} = \frac{UT \text{ etapas}}{UT \text{ controle}} \times 100$$

e o fator de purificação (P) é a relação da atividade específica obtida após cada etapa de purificação, dividida pelo valor em atividade específica do controle (extrato bruto):

$$P = \frac{AE \text{ etapas}}{AE \text{ controle}}$$

#### **4.7. Determinação do grau de pureza da pectinase semi-purificada de *A. japonicus* (PGAj)**

##### **4.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes – SDS-PAGE**

Para visualizar a pureza da amostra obtida após as etapas de purificação de *A. japonicus*, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) sob condição desnaturante (SDS-PAGE), contendo SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, conforme descrito por Laemmli et al. (1970). Para o extrato bruto e para a PGAj uma quantidade de 50 e 30 microgramas, respectivamente, foram aplicadas em 20  $\mu$ L de tampão de amostra contendo tampão Tris.HCl 1 M pH 6,8, 5  $\mu$ L de azul de bromofenol 0,1% e 5  $\mu$ L de mercaptoetanol, fervidas durante 5 min, sendo 20  $\mu$ L aplicados no gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas em tampão Tris 0,05 M/glicina 0,384 M/SDS 2%, pH 8,3, diluído 1:1 em água. Após a aplicação, a tensão elétrica foi fixada em 120 V sendo os géis feitos em placas do Sistema de gel Mini-PROTEAN da Bio-Rad. Após a corrida o gel foi fixado e corado com nitrato de prata conforme descrito no item 4.7.4. Os marcadores de massa molecular utilizados foram os da BioRad 1610363, uma mistura de 10 proteínas altamente purificadas, com suas massas moleculares pré-definidas.

#### **4.7.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas (PAGE)**

Para verificar a homogeneidade da PGAj foi feita eletroforese em condição nativa (PAGE) em gel de poliacrilamida (10%) segundo o método de Davis (1964). Uma quantidade de 50 microgramas foi aplicada em 200 µL de tampão de corrida contendo tampão Tris.HCl 0,05 M, pH 8,3/glicina 0,384 M, 20 µL de glicerol e 20 µL de azul de bromofenol 0,1%, sendo 20 µL aplicados no gel. As corridas eletroforéticas foram realizadas em tampão Tris.HCl 0,05 M, pH 8,3/glicina 0,384 M, diluído 5 vezes. Após a aplicação, a tensão elétrica foi fixada em 120 V sendo os géis feitos em placas do Sistema de gel Mini-PROTEAN da Bio-Rad. Após a corrida o gel foi fixado e corado com nitrato de prata conforme descrito no item 4.7.4.

#### **4.7.3. Zimograma**

Diferentes concentrações (10, 30, 50 e 100 µg) da PGAj foram submetidas a técnica de zimograma através da eletroforese em gel PAGE 8.9 (10%) (v/v), como descrito no item 4.7.2, co-polimerizado com pectina citrus 0,1% (m/v), como descrito por Cruickshank & Wade (1980).

Após a corrida da eletroforese, o gel foi incubado em solução de Triton X-100 2,5% (v/v) por 30 min, sob agitação, em temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi incubado em tampão Acetato de sódio, 100 mM, pH 4,0, a 50 °C por 90 min. A reação foi interrompida pelo resfriamento do gel em banho de gelo por 30 min. Posteriormente, o gel foi lavado com água deionizada e imerso em solução vermelho de rutênio 0,05% (m/v) sob agitação por 30 min para corar a pectina. Por fim, o gel foi descorado com água destilada até o aparecimento das bandas translúcidas.

#### **4.7.4. Coloração dos géis de eletroforese**

As proteínas presentes nos géis foram reveladas com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum et al. (1987). Após a corrida eletroforética, os géis foram colocados em 50 mL de solução fixadora (metanol 50%, ácido acético glacial 12% e 25 µL de formaldeído 37%) durante 30 min, seguido de 3 lavagens de 10 min com solução de etanol 50% (v/v). Os géis foram lavados e tratados durante 30 segundos com uma solução de tiosulfato de sódio 0,02%. Em seguida, os géis foram lavados por 10 segundos por 3 vezes com água destilada e incubados, por 10 min, em solução de nitrato de prata 0,2% (p/v), contendo 37,5 µL

de formaldeído 37% (v/v) e lavados 2 vezes, por 10 segundos, com água destilada. Posteriormente, os géis foram tratados com a solução reveladora (carbonato de sódio 6%, contendo 1 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02% e 25 µL de formaldeído 37%), até a visualização das bandas protéicas. A reação foi interrompida com solução de metanol 50% e ácido acético 12%, durante 10 min sob agitação. Por fim, o gel foi lavado com metanol 50% durante 20 min.

#### **4.8. Cromatografia líquida com espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) – Laboratório do Professor Rolf Prade / USA**

A cromatografia líquida com espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) detectou todos os peptídeos presentes na amostra semi-purificada de *A. japonicus* (PGAj) após digeridos com tripsina. Os dados obtidos contêm o número de hits de peptídeos únicos (# pep.), a porcentagem de cobertura de sequências de aminoácidos das proteínas identificadas (% cobertura), o peso molecular (kDa), e a composição molar (iBAQ), sendo a identificação baseada na comparação dos peptídeos da amostra com bancos de dados genéticos (GenBank - NCBI).

#### **4.9. Caracterização enzimática da PGAj**

##### **4.9.1. pH e temperatura ótimos para atividade da PGAj**

O pH ótimo da PGAj foi determinado a 60 °C, incubando a enzima com tampão acetato de sódio 100 mM pH 4 – 5,5; tampão Hepes 100 mM pH 7,0 – 8,0; tampão Trizma.HCl 100 mM pH 8,0 – 9,0; e tampão McIlvaine pH 3,0 – 6,5, contendo pectina citrus 1% como substrato.

A temperatura ótima foi determinada incubando a enzima em temperaturas variando de 40 – 70 °C, em McIlvaine pH 4,0, contendo pectina citrus 1% como substrato. As atividades relativas foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima para o pH e temperatura ótimos.

##### **4.9.2. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da PGAj**

Para avaliar o efeito do pH na estabilidade da PGAj, 100 µL da enzima foi misturado com 50 µL de tampão McIlvaine na faixa de pH de 3,0 – 6,0, em banho de gelo, durante 24 h.

As atividades residuais foram avaliadas no intervalo de 30 min até 24 h. Após cada tempo de pré-incubação, uma alíquota de 100 µL de amostra foi retirada e então o ensaio enzimático foi realizado conforme o item 4.4.

Também foi avaliada a estabilidade enzimática nas temperaturas de 50 e 55 °C, em diferentes tempos de incubação: 10, 20, 40, 60, 120 e 240 min. Após cada tempo de pré-incubação, uma alíquota de 100 µL de amostra foi retirada e então o ensaio enzimático foi realizado conforme o item 4.4.

A atividade foi expressa como atividade residual, sendo que o valor de 100% correspondeu à atividade realizada em pH e temperatura ótima da enzima.

#### **4.10. Especificidade da PGAj ao substrato**

Ensaio enzimáticos foram realizados com diversos substratos (1%) com o objetivo de determinar a especificidade da enzima, tais como: pectina cítrica (Sigma P9135); pectina de maçã (Sigma P93854); ácido poligalacturônico (Sigma P3888); xilana de bétula (Sigma X0502); xilana de aveia (Sigma X0627); amido; sacarose e caseína.

Os ensaios de atividades foram realizados conforme o item 4.4 e as atividades relativas foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima.

#### **4.11. Imobilização da PGAj em alginato de cálcio**

##### **4.11.1. Efeito da concentração de CaCl<sub>2</sub> na imobilização da PGAj**

Para a encapsulação em esferas de alginato de cálcio foi preparada uma solução de alginato de sódio 4% dissolvido em água e após solubilização completa foi adicionada a pectinase semi-purificada (PGAj) na proporção de 1:1 (250 µL de alginato: 250 µL de enzima). Uma solução de cloreto de cálcio em diferentes concentrações (0,03 – 0,8 M) foi adicionada em uma placa sob agitação, e a mistura de enzima e alginato de sódio foi gotejada na solução de cloreto, promovendo a formação de pequenas esferas de alginato de cálcio contendo as enzimas aprisionadas. Após 1 h no cloreto a amostra foi lavada 3 vezes com tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0 e em seguida foi dosada a atividade enzimática a 50 °C de forma adaptada para a imobilizada (conforme item 4.4).

#### 4.11.2. Efeito da concentração de alginato de sódio na imobilização da PGAj

A encapsulação em esferas de alginato foi realizada em diferentes concentrações de alginato de sódio (1,0 - 4,5%) e após solubilização completa foi adicionada a pectinase purificada (PGAj) na proporção de 1:1 (250 µL de alginato: 250 µL de enzima). Uma solução de cloreto de cálcio 0,1 M foi adicionada em uma placa sob agitação, e a mistura de enzima e alginato de sódio foi gotejada na solução de cloreto, promovendo a formação de pequenas esferas de alginato de cálcio contendo as enzimas aprisionadas. A amostra foi lavada 3 vezes com tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0 e em seguida foi dosada a atividade enzimática a 50 °C de forma adaptada para a imobilizada (conforme item 4.4).

#### 4.11.3. Reuso da PGAj imobilizada

Os experimentos de reuso da enzima imobilizada foram realizados com alginato de sódio 2% (1 mL alginato: 1 mL de enzima) e cloreto de cálcio 0,1 M com 30 min e 1 h de hidrólise a 50 °C. A primeira dosagem foi considerada 100 % e após cada ciclo foi feita a lavagem das esferas com tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0 para um novo ciclo. Esse processo foi repetido durante 6 ciclos. Para a confirmação do processo de imobilização, foram realizados ensaios de atividade enzimática, pelo método de DNS, no derivado (enzima encapsulada) e enzimas livres (controle da atividade inicial). Neste experimento a dosagem foi em volume cinco vezes maior para possibilitar a retirada de alíquotas para quantificação (5 mL ao total na mistura de incubação – 2,5 mL de tampão acetato de sódio pH 4,0 com pectina 1%, 2 mL de água e a enzima imobilizada).

#### 4.12. Aplicação da pectinase (extrato bruto) e semi-purificada de *A. japonicus* na clarificação de sucos

A capacidade da pectinase de *A. japonicus* (extrato bruto) em clarificar sucos foi avaliada usando 13 frutas: maçã (Argentina), maçã (Europa), maçã (Grandsmith) (*Malus domestica* Borkh), banana da terra (*Musa sapientum* L.), banana nanica (*Musa acuminata*, ‘Dwarf Cavendish’), manga (Haden) (*Mangifera indica* L. ‘Haden’), manga (Palmer) (*Mangifera indica* L., ‘Palmer’), manga (Tommy) (*Mangifera indica* ‘Tommy Atkins’), pêssigo (*Prunus persica*), pera (D’Anjou) (*Pyrus communis* ‘D’Anjou’), pera (Portuguesa) (*Pyrus* L.), pera (“red”) (*Pyrus* L.) e goiaba branca (*Psidium guajava*).

E para a enzima semi-purificada (PGAj) foram utilizadas também 13 frutas: acerola (*Malpighia emarginata*), banana nanica (*Musa acuminata* 'Dwarf Cavendish'), goiaba branca (*Psidium guajava*), guavira (*Campomonesia adamantium*), pera (*Pyrus* L.), maçã gala (*Malus domestica* Borkh), mamão (*Carica papaya*), manga (Palmer) (*Mangifera indica* L. cv. 'Palmer'), manga (Tommy) (*Mangifera indica* 'Tommy Atkins'), melão (*Cucumis melo*), ponkan (*Citrus reticulata*), uva isis (*Vitis vinifera* L.) e uva vitória (*Vitis vinifera* L.). Todas as frutas foram adquiridas em mercados, lavadas, descascadas e maceradas usando um "mixer" para obter a polpa. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados da enzima comercial, pectinex®.

As polpas foram incubadas (sem diluir com água) com 3 U/mL das enzimas (2 mL de extrato bruto, semi-purificada e pectinex®) na proporção de 1:1 (v/v), a 40 °C para o extrato bruto e, 40 e 50 °C para a PGAj e a pectinex®, durante 4 h sob agitação (140 rpm). Após esse período, as amostras foram fervidas por 5 min para inativação enzimática e centrifugadas a 10000 g por 20 min. O sobrenadante (suco) foi utilizado para determinar a clareza do suco, registrando a transmitância a 650 nm, tomando água destilada como branco. Para cada uma das polpas de frutas, foi realizado um controle utilizando polpa e enzima desnaturada (1:1, v/v). A clarificação foi calculada da seguinte forma:

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

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

#### **4.12.1. Efeito do tempo de tratamento e da concentração de pectinase (extrato bruto) e da PGAj na clarificação do suco de manga (Palmer)**

O efeito do tempo de tratamento para clarificação do suco foi feito usando a polpa de manga (Palmer), em tempos variando de 30 a 240 min, usando 3 U/mL da PGAj na proporção de 1:1 (v/v).

Diferentes concentrações de enzima também foram avaliadas: 0,38, 0,75, 1,5, 2,25 e 3 U/mL durante 4 h de incubação. Ambos os testes foram realizados a 40 e 50 °C, sob agitação (140 rpm).

#### **4.13. Microscopia óptica**

As amostras de polpa de suco de manga (Palmer) controle (sem tratamento com a enzima) e clarificadas com a pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* foram homogeneizadas com um agitador magnético a 500 rpm durante 5 min. Retirou-se 2 mL das amostras e adicionou-se 50 µL de vermelho de rutênio 0,002%. De cada amostra (controle e tratado), retirou-se 50 µL de solução corada, que foram espalhados suave e uniformemente sobre a lâmina de observação. Foi utilizado o microscópio óptico modelo Leica DM5500 B, e as amostras foram observadas com aumento de 20 vezes (Ongaratto & Viotto, 2015).

#### **4.14. Análise dos resultados**

Todos os experimentos descritos anteriormente foram realizados em triplicata e analisados de acordo com as metodologias pré-estabelecidas e padronizadas em nosso laboratório (Guimarães et al., 2013), um fator por vez (OFAT), e os valores obtidos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Os dados de especificidade ao substrato e clarificação de sucos de frutas foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste post hoc de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas em  $p < 0,05$ . Os softwares utilizados foram o SISVAR 5.6 (Ferreira, 2011) e o GraphPad Prism versão 8 (San Diego, California, USA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**5. CAPÍTULO 1.** Produção e caracterização bioquímica da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* e aplicação da enzima na clarificação de sucos de frutas

### 5.1. Produção de pectinases extracelulares (extrato bruto) por *A. japonicus* usando diferentes substratos em cultivo submerso (SC) e em estado sólido (SSC)

A maior produção de pectinase por *A. japonicus* em SSC foi com casca de maracujá (3- CM) com  $30,2 \pm 0,33$  U/g de substrato seco (ou  $3,02 \pm 0,33$  U/mL), seguida da erva-mate fina usada (8- EMFCUS) com  $21,1 \pm 0,27$  U/g de substrato seco (ou  $2,11 \pm 0,27$  U/mL), erva-mate tereré média fina usada (9- EMTMFUS) com  $18,8 \pm 0,11$  U/g de substrato seco (ou  $1,88 \pm 0,11$  U/mL), farinha de soja (21- FS) com  $14,7 \pm 0,16$  U/g de substrato seco (ou  $1,47 \pm 0,16$  U/mL), e farelo de trigo (17- FT) com  $10,4 \pm 0,16$  U/g de substrato seco (ou  $1,04 \pm 0,16$  U/ml) (**Tabela 3**).

Em SC, as maiores produções foram na condição estacionária quando comparadas à produção sob agitação para quase todas as fontes de carbono testadas, com exceção da farinha de mandioca de Furnas do Dionísio/MS (11- FFD). As melhores produções foram com a casca de laranja extrusada (4- CEL) em condição estacionária ( $1,55 \pm 0,23$  U/mL) e agitada ( $1,48 \pm 0,05$  U/mL), seguida da casca de maracujá (3- CM) com  $1,33 \pm 0,08$  U/mL em condição estacionária e  $1,28 \pm 0,07$  U/mL sob agitação, palha de milho (20- PMi) ( $1,18 \pm 0,07$  U/mL – estacionária) e farinha de mandioca grossa do Pará (13- FGP) com  $1,11 \pm 0,02$  U/mL na condição estacionária.

**Tabela 3.** Produção de pectinase (extrato bruto) por *A. japonicus* usando diferentes substratos de baixo custo

SUBSTRATOS	Cultivo submerso		Cultivo em estado sólido
	Agitado	Estacionário	
	U/mL	U/mL	U/g de substrato seco
1- CL	$0,00 \pm 0,00$	$0,00 \pm 0,00$	Nd

2- BL	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	Nd
3- CM	1,28 ±0,07 <sup>a</sup>	1,33 ±0,08 <sup>ab</sup>	30,2 ±0,33 <sup>a</sup>
4- CEL	1,48 ±0,05 <sup>a</sup>	1,55 ±0,23 <sup>a</sup>	2,0 ±0,03 <sup>e</sup>
5- EMFC	0,09 ±0,05 <sup>cd</sup>	0,38 ±0,03 <sup>fghi</sup>	6,9 ±0,23 <sup>de</sup>
6- EMTMF	0,10 ±0,02 <sup>cd</sup>	0,48 ±0,01 <sup>efgh</sup>	4,4 ±0,08 <sup>de</sup>
7- EMTG	0,09 ±0,05 <sup>cd</sup>	0,66 ±0,08 <sup>efg</sup>	1,2 ±0,04 <sup>e</sup>
8- EMFCUS	0,02 ±0,03 <sup>d</sup>	0,04 ±0,02 <sup>i</sup>	21,1 ±0,27 <sup>b</sup>
9- EMTMFUS	0,06 ±0,05 <sup>cd</sup>	0,09 ±0,03 <sup>hi</sup>	18,8 ±0,11 <sup>b</sup>
10- EMTGUS	0,06 ±0,05 <sup>cd</sup>	0,17 ±0,04 <sup>hi</sup>	7,3 ±0,11 <sup>de</sup>
11- FFD	0,92 ±0,10 <sup>b</sup>	0,75 ±0,05 <sup>cdef</sup>	1,8 ±0,09 <sup>e</sup>
12- FR	0,16 ±0,05 <sup>cd</sup>	0,87 ±0,31 <sup>cde</sup>	3,5 ±0,14 <sup>de</sup>
13- FGP	0,13 ±0,07 <sup>cd</sup>	1,11 ±0,02 <sup>abcd</sup>	6,0 ±0,40 <sup>de</sup>
14- FGC	0,12 ±0,06 <sup>cd</sup>	0,75 ±0,08 <sup>cdef</sup>	3,0 ±0,14 <sup>e</sup>
15- FM	0,21 ±0,14 <sup>cd</sup>	0,28 ±0,05 <sup>ghi</sup>	Nd
16- FGCSA	0,06 ±0,02 <sup>cd</sup>	0,75 ±0,03 <sup>cdef</sup>	3,8 ±0,03 <sup>de</sup>
17- FT	0,13 ±0,02 <sup>cd</sup>	0,82 ±0,21 <sup>cdef</sup>	10,4 ±0,16 <sup>cd</sup>
18- G	0,12 ±0,07 <sup>cd</sup>	0,90 ±0,04 <sup>bcde</sup>	Nd
19- BCE	0,10 ±0,05 <sup>cd</sup>	0,15 ±0,08 <sup>hi</sup>	Nd
20- PMi	0,76 ±0,09 <sup>b</sup>	1,18 ±0,07 <sup>abc</sup>	7,1 ±0,05 <sup>de</sup>
21- FS	0,31 ±0,08 <sup>c</sup>	0,72 ±0,01 <sup>defg</sup>	14,7 ±0,16 <sup>bc</sup>
CV (%)	20,20	16,23	20,56

O *A. japonicus* foi crescido durante 96 h em cultivo submerso e durante 120 h em cultivo em estado sólido, ambos à 35 °C. **Abreviações dos substratos (1%):** casca de laranja em pó (1-CL); bagaço de laranja em pó (2-BL); casca de maracujá em pó (3-CM); casca extrusada de laranja (4-CEL); erva-mate fina de chimarrão (5-EMFC); erva-mate de tereré média fina (6-EMTMF); erva-mate de tereré grossa (7-EMTG); erva-mate fina de

chimarrão usada (8- EMFCUS); erva-mate de tereré média fina usada (9-EM6US); erva-mate de tereré grossa usada (10-EM7US); farinha de mandioca de Furnas do Dionísio/MS (11-FFD); farinha de mandioca de Rondonópolis/MT (12-FR); farinha de mandioca grossa do Pará (13-FGP); farinha de mandioca grossa Cuiabana/MT (14-FGC); farinha de milho (15-FM); farinha de mandioca grossa Cruzeiro do Sul/Acre (16-FGCSA); farelo de trigo (17-FT); glicose (18-G); bagaço de cana explodido (19-BCE); palha de milho (20-PMi); e farinha de soja (21-FS). Legenda: Nd – não determinada. CV (%) – coeficiente de variância. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições; e as médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Considerando que a casca de maracujá (3- CM) em SSC foi o substrato que induziu a maior produção da pectinase por *A. japonicus*, e o segundo melhor em SC, esse foi o substrato utilizado para dar sequência nos experimentos.

A produção de pectinases por fungos (Garzon et al., 2021; Kaur et al., 2020; Rocha et al., 2020), leveduras (Ezeh et al., 2023; Bezus et al., 2022; Haile & Kang, 2019) e por bactérias (Tasgin et al., 2020; Murugan et al., 2020) em cultivo submerso (SC) e em estado sólido (SSC) são extensivamente estudadas (Haile & Ayele, 2022). Um dos trabalhos pioneiros com SSC para produção de pectinase, mostrou uma produção cerca de 11 vezes maior em SSC do que SC por *A. niger* (Solis-Pereira et al., 1993). Como trata-se de um processo que ocorre quase na ausência de água livre ou qualquer líquido entre as partículas do substrato, é atribuído que o aumento da produção de poligalacturonase em SSC, em comparação com SC, seja devido à expressão de uma segunda poligalacturonase (PG II), que é bioquimicamente diferente daquela produzida em SC (Nighojkar et al., 2019; Niture & Pant, 2004).

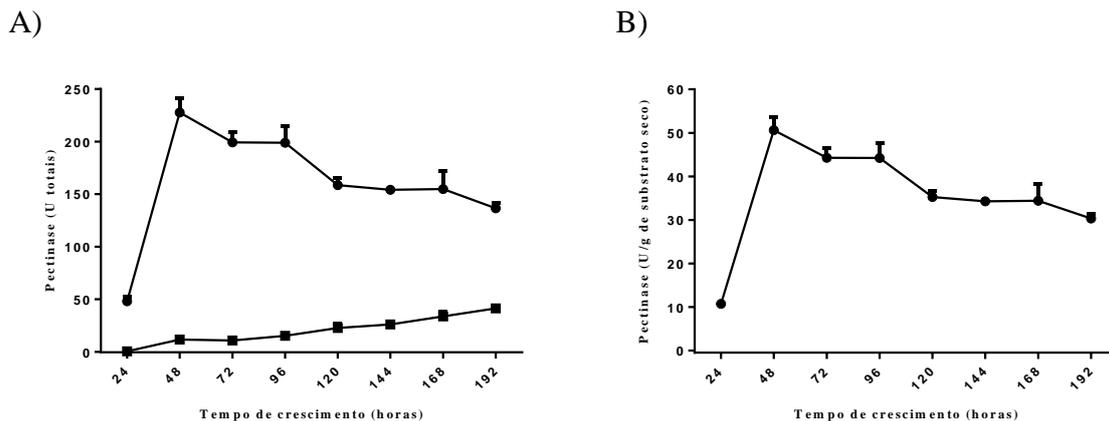
Mais de 30 gêneros diferentes de bactérias e fungos foram usados para produção de poligalacturonase (Favela-Torres et al., 2005), dentre eles, *Erwinia*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Rhizopus* (Nighojkar et al., 2019).

Dentre as várias espécies de fungos relatadas na literatura como produtoras de pectinases a partir de resíduos agroindustriais, as do gênero *Aspergillus* sp. são as mais citadas, como: *Aspergillus aculeatinus* com polpa de beterraba e farelo de colza como substrato em SSC (Garzon et al., 2021); *A. niger* a partir de farelo de trigo em SC (Kaur et al., 2020); *A. terreus* em bagaço de cana de açúcar – SSC (Vaz et al., 2020); *A. fumigatus* MS16 com casca de banana – SSC e SC (Zehra et al., 2020); *A. niger* com bagaço de laranja e bagaço de cana-de-açúcar – SSC (Mahmoodi et al., 2019); *A. aculeatus* URM4953 com casca de maracujá (Silva et al., 2019a) – SC; *A. awamori* em SSC com casca de laranja (Marzo et al., 2018); *A. japonicus* em bagaço de cana de açúcar (Ferreira et al., 2018) e *A. niger* com resíduo de casca de laranja (Ahmed et al., 2015) – SC; *A. giganteus* em uma mistura de farelo de trigo e cascas de laranja e limão – SSC (Ortiz et al., 2016); *A. japonicus* com casca de laranja – SC (Li et al., 2015a); pó de casca de laranja e farelo de trigo em SC e SSC (Li et al., 2015b); *A. niveus* com casca de

maçã, casca de laranja e casca de maracujá em SC, e em SSC, com farelo de trigo e casca de maçã (Maller et al., 2012); entre outros.

## 5.2. Efeito do tempo de crescimento para produção da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus*

O efeito do tempo de crescimento para produção de pectinase (extrato bruto) por *A. japonicus* foi determinado usando casca de maracujá como substrato por um período de 24 - 192 h. O pico de produção foi após 48 h de cultivo (A) 227,75 ±13,1 U totais ou B) 50,62 ±2,9 U/g de substrato seco) em SSC, decaindo em tempos superiores. Em SC a produção foi muito inferior em todo período, com pico de produção após 192h (36,72 ±3,38 U totais ou 0,92 ±0,08 U/mL) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Efeito do tempo de crescimento para produção de pectinase (extrato bruto) por *A. japonicus* em U totais (cultivo submerso e cultivo em estado sólido) e U/g de substrato seco (cultivo em estado sólido). O fungo foi crescido em SC com 1% de casca de maracujá e em SSC com 5 gramas de casca de maracujá em condição estacionária a 35 °C, conforme descrito no item 4.3. Os valores são médias ± desvios padrão de 3 repetições.

Há uma grande variedade de tempos de crescimentos para produção de pectinases por fungos descrita na literatura. Semelhante ao *A. japonicus* do presente trabalho, a produção máxima de pectina liase por *Penicillium griseoroseum* em 25% de xarope de cana de açúcar também foi em 48h de cultivo, no entanto com produção máxima de 72 U totais (Piccoli-Valle et al., 2001). Outro estudo reporta que a produção máxima de pectinases por *Aspergillus* spp. foi também com 48 h de crescimento em cultivo submerso usando pectina como substrato (106,7 U/mL) (Sudeep et al., 2020). E em outro trabalho com *A. japonicus* houve uma produção máxima de apenas 0,53 U/mL de pectinase após 168 h de cultivo (Ferreira et al., 2018),

resultado inferior ao *A. japonicus* deste trabalho que produziu 0,92 U/mL com o mesmo tempo de crescimento.

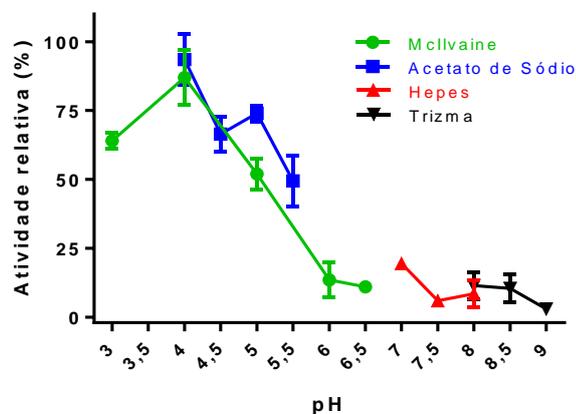
Sandri & Silveira (2018) mostraram que *A. niger* teve sua maior produção de pectinases após 72 h de crescimento, com 64 U/g de peso seco de pectinase em um meio com adição de pectina e 68 U/g de peso seco em um meio sem glicose, enquanto o *A. japonicus* do presente estudo produziu 50,62 U/g de substrato seco de pectinase em 48 h, usando somente casca de maracujá como substrato. No estudo de Silva et al. (2019a), *A. aculeatus* URM4953 teve sua maior produção ( $2,92 \pm 0,12$  U/mL de poligalacturonase e  $6,51 \pm 0,04$  U/mL de endo-PG) usando casca de maracujá após 96 h de cultivo; uma espécie de *A. niveus* teve produção máxima de pectina liase após 96 h de cultivo (150 U totais) usando pectina como substrato (Maller et al., 2012).

O ciclo de fermentação mais curto torna a aplicação de *A. japonicus* para produção de pectinase mais econômico para exploração comercial.

### 5.3. Caracterização bioquímica da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus*

#### 5.3.1. Efeito do pH e da temperatura na atividade da pectinase (extrato bruto)

A pectinase (extrato bruto) apresentou atividade máxima em pH 4,0 em ambos os tampões, acetato de sódio 100 mM e McIlvaine (**Figura 9**), mantendo mais de 50% de atividade em pHs de 3,0 a 5,5. Para os valores acima destes verificamos uma queda de mais de 80% da atividade.



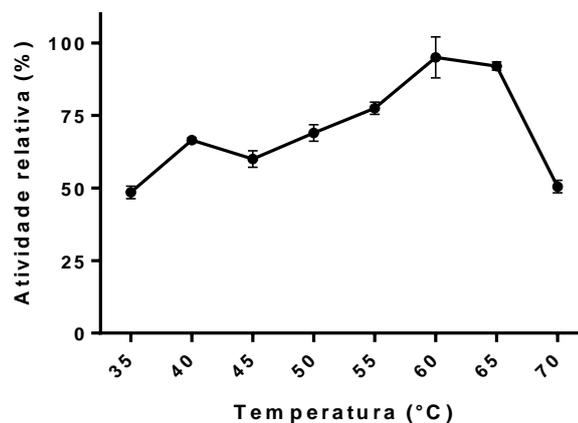
**Figura 9.** Efeito do pH na atividade da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus*. A atividade foi determinada em pHs 3,0 – 9,0, utilizando 4 tampões (McIlvaine, acetato de sódio, Hepes e Trizma), a 45 °C. As atividades relativas

foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

Na literatura, as pectinases fúngicas apresentam alta atividade enzimática em pHs na região levemente ácida, de 3,0 a 5,5 (Santi et al., 2014), em conformidade com os resultados presentes neste estudo. Uma vez que este intervalo de pH ácido é frequente em muitos sucos de frutas, os dados obtidos sugerem que este extrato é um candidato com potencial para uma aplicabilidade na clarificação de sucos de frutas.

O efeito da temperatura na atividade da pectinase (extrato bruto) foi avaliado na faixa de 35 a 70 °C, usando tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,0. O gráfico mostra que a temperatura ótima foi de 60 °C, sendo observada uma queda de apenas 10% a 65 °C, mantendo ainda 50% de atividade a 70 °C (**Figura 10**).

Este resultado se mostra interessante pois altas temperaturas são comumente empregadas em vários processos industriais para diferentes propósitos, e na maioria desses processos, o material submetido ao aquecimento precisa ser resfriado antes do tratamento enzimático. Assim, o uso de pectinases tolerantes em altas temperaturas como a pectinase de *A. japonicus*, poderiam eliminar a etapa de resfriamento, diminuindo os custos finais do processo (Brienzo et al., 2009). Além disso, o aumento da temperatura aumenta a taxa de reação enzimática devido ao aumento da energia cinética das moléculas presentes na reação. Dessa forma, enzimas que demonstram características de ativação e estabilidade em temperaturas elevadas apresentam interesse industrial, pois as mesmas poderiam, por exemplo, aumentar a velocidade da reação, diminuindo o tempo de reação no reator (Poletto, 2015).

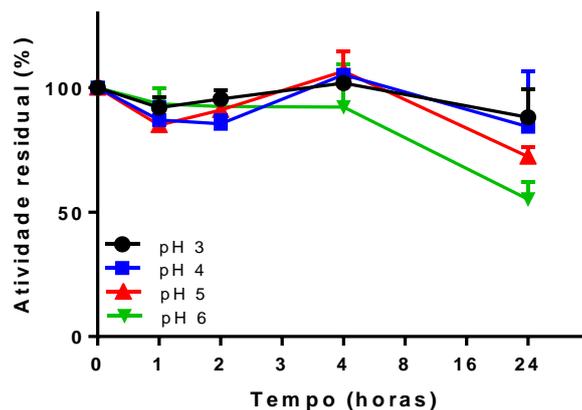


**Figura 10.** Efeito da temperatura na atividade da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus*. A atividade enzimática foi determinada em temperaturas com variações entre 35 e 70 °C, em tampão acetado de sódio 100 mM pH 4,0. As atividades relativas foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

Resultados semelhantes foram reportados em um estudo com *A. fumigatus* MS16, usando casca de banana como substrato, onde foi observado que a atividade da pectinase produzida em cultivo sólido exibiu atividade ótima a 60 °C, e o pH ótimo da pectinase foi 5,0 (Zehra et al., 2020); os estudos de Sudeep et al. (2020) reportaram uma pectinase de *Aspergillus* sp. com temperatura ótima a 30 °C e pH 5,8; outro trabalho com uma exo-pectinase produzida por *A. niger* LB23 também apresentou atividade máxima em pH 4,0, porém temperatura ótima de 40 e 50 °C, com pequena queda de atividade a 60 °C (Sandri et al., 2013); a temperatura e o pH para atividade da poligalacturonase de *A. tamarii* foi entre 40 – 70 °C e pH 5,0, respectivamente, enquanto da pectina liase foi 60 °C e pH 7,5, respectivamente (Amande et al., 2013); e a exo-poligalacturonase e a pectina liase de *A. niveus* tiveram temperatura ótima de 55 °C e pHs de 4,0 e 8,5, respectivamente (Maller et al., 2011, 2012).

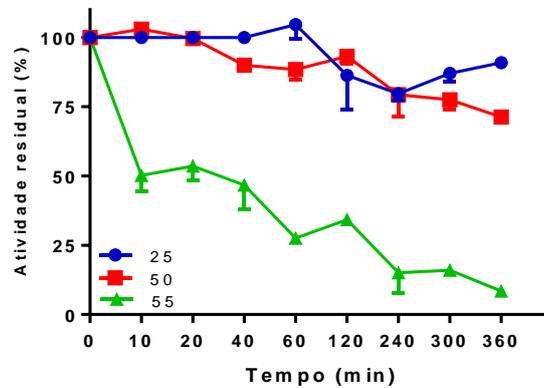
### 5.3.2. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da pectinase (extrato bruto)

A estabilidade da pectinase (extrato bruto) foi avaliada em diferentes pHs, sendo observado que a enzima ficou totalmente estável durante 4 h em todos os pHs testados, mantendo ainda 88, 84 e 72% da atividade em pHs 3,0, 4,0 e 5,0, respectivamente, após 24 h. E em pH 6,0 a enzima ainda manteve 55% da atividade inicial após 24 h (**Figura 11**).



**Figura 11.** Efeito do pH na estabilidade da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus*. A enzima foi incubada em pHs variando de 3,0 – 6,0 durante um período de até 24 h. Alíquotas foram retiradas nos tempos indicados para a dosagem de atividade enzimática residual, que foi feita conforme o item 4.4. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

A termoestabilidade da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* foi medida através de ensaios em diferentes temperaturas nos quais foi dosada a atividade da enzima após um período 360 min de incubação a 25, 50 e 55 °C (Figura 12).



**Figura 12.** Efeito da temperatura na estabilidade da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus*. A enzima foi incubada em temperaturas de 25, 50 e 55 °C durante um período de até 360 min. Alíquotas foram retiradas nos tempos indicados para a dosagem de atividade enzimática residual, que foi feita conforme o item 4.4. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

Podemos observar que a pectinase de *A. japonicus* se manteve estável durante 6 h (91% da atividade inicial) na bancada (temperatura de aproximadamente 25 °C). A 50 °C a enzima manteve 71% de atividade durante 6 h. Todavia na temperatura de 55 °C, a meia-vida da enzima foi atingida logo nos primeiros 10 min (50,2%), posteriormente caindo gradativamente com o aumento no tempo de incubação até atingir 8,5% após 6 h.

Os resultados obtidos neste estudo foram melhores do que os apresentados pela poligalacturonase de *A. niger* IOC 4003, que indicaram estabilidade da enzima por 2 h a 30 e 40 °C, e nos pHs de 4,0 a 6,0, onde a poligalacturonase manteve acima de 75% de atividade (Rocha et al., 2020).

#### 5.4. Aplicação da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* na clarificação de sucos de frutas

A adição de pectinases e outras enzimas despolimerizantes, é amplamente utilizada na indústria de processamento de frutas e vegetais, onde sua ação é hidrolisar os polissacarídeos reduzindo sua viscosidade, dando um aspecto cristalino ao produto final, além de aumentar o rendimento do suco e reduzir o tempo de filtração em até 50% (Dal Magro et al., 2019), aspecto

crystalino que pode ser observado na figura 11A e através dos resultados da clarificação (Tabela 4).

Tendo em vista a grande importância das pectinases no processo de clarificação de sucos, foi testada a capacidade de clarificação da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* comparada com a pectinase comercial (Pectinex®) em 13 frutas (Tabela 4).

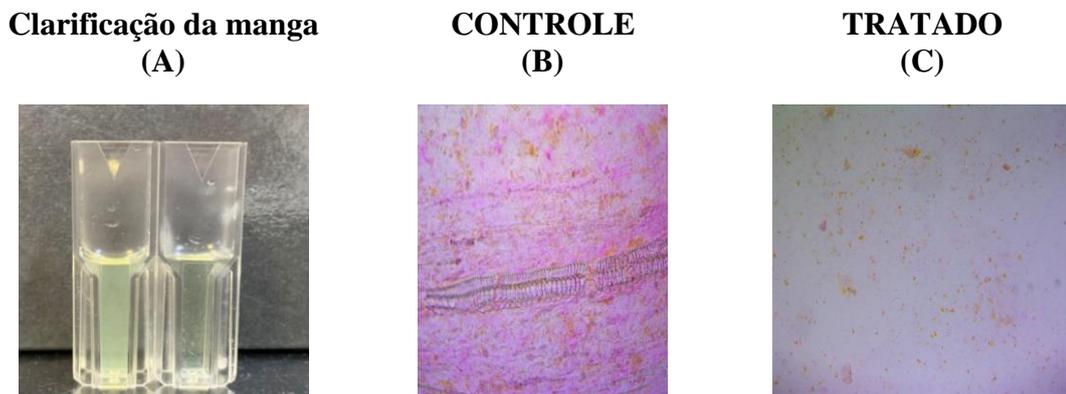
**Tabela 4.** Aplicação da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* na clarificação de sucos de frutas

CLARIFICAÇÃO DOS SUCOS DE FRUTAS (%)			
Frutas (em natura)	Pectinase	Pectinex	pH dos sucos
Maçã (Argentina)	66,32 ±15,7 <sup>a</sup>	12,67±1,0 <sup>b</sup>	4,1-4,5
Maçã (Europa)	52,59 ±0,0 <sup>a</sup>	13,34 ±4,5 <sup>b</sup>	3,9-4,3
Maçã (Grandsmith)	30,67 ±1,2 <sup>a</sup>	5,10 ±0,4 <sup>b</sup>	3,8-4,2
Banana da terra	49,04 ±2,8 <sup>a</sup>	38,29 ±3,7 <sup>a</sup>	4,2-4,6
Banana nanica	19,6 ±0,3 <sup>a</sup>	15,6 ±0,5 <sup>a</sup>	4,8-5,5
Manga (Haden)	85,56 ±6,0 <sup>a</sup>	50,89 ±8,4 <sup>b</sup>	3,7-4,1
Manga (Palmer)	46,7 ±1,0 <sup>a</sup>	49,3 ±1,8 <sup>a</sup>	4,1-4,5
Manga (Tommy)	16,6 ±0,1 <sup>b</sup>	21,2 ±1,4 <sup>a</sup>	3,7-3,9
Pêssego	9,47 ±0,2 <sup>a</sup>	5,20 1,2 <sup>b</sup>	3,7-4,0
Pera (D'Anjou)	22,60 ±3,5 <sup>a</sup>	9,56 ±1,0 <sup>b</sup>	4,4-4,7
Pera (Portuguesa)	25,59 ±1,2 <sup>a</sup>	6,96 ±4,8 <sup>b</sup>	4,9-5,2
Pera ("red")	13,85 ±1,6 <sup>a</sup>	8,41 ±1,5 <sup>a</sup>	4,1-4,5
Goiaba branca	46,4 ±0,6 <sup>a</sup>	33,6 ±1,7 <sup>b</sup>	3,7-3,9

A clarificação dos sucos de frutas foi feita com 2 mL de polpa de cada fruta e 2 mL da pectinase (extrato bruto) (3 U/mL totais) de *A. japonicus* e da Pectinex à 40 °C. Os valores de clarificação (%) foram calculados seguindo Rosmine et al. (2017) por transmitância. Os valores são dados como média  $\pm$  desvio padrão de 3 repetições, e as diferentes letras dentro de cada linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

A pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* foi superior à pectinase comercial (Pectinex) em todas as frutas avaliadas (exceto na manga (Tommy)), onde a melhor clarificação foi obtida com manga (Haden) com 85,56% (**Figura 13**), enquanto a Pectinex clarificou apenas 50,89%. Com a maçã (Argentina), a pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* foi 5 vezes mais eficiente na clarificação do que a Pectinex, com 66,32% e 12,67% de clarificação, respectivamente. E nos sucos de maçã (Europa), banana da terra, manga (Palmer) e goiaba branca, a pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* apresentou 52,59%, 49,04%, 46,7% e 46,4% de clarificação, respectivamente, enquanto a Pectinex apresentou resultados menores ou significativamente semelhantes (13,34%, 38,29%, 49,3% e 33,6%, respectivamente).

Na **Figura 13A**, observa-se a clarificação obtida com a polpa de manga (Haden), quando tratada com a pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* (direita) comparada com o controle (esquerda). A degradação da pectina usando a mesma polpa também foi observada através de microscopia óptica, onde verifica-se uma redução deste polissacarídeo quando tratado com pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* (**Figura 13C**).



**Figura 13.** Clarificação do suco de manga (Haden) pela pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus*. (A) Controle (esquerda) e tratado com a pectinase de *A. japonicus* (direita); Polpa de manga (Haden): (B) Controle - sem tratamento; (C) Tratado com pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus*. As fotos das lâminas foram feitas em aumentos de 20x em microscopia óptica e coradas com vermelho de rutênio 0,002%.

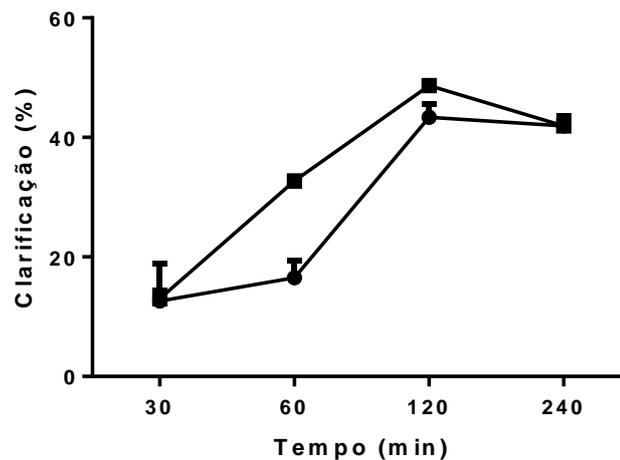
O extrato enzimático bruto de fungos possui inúmeras aplicações industriais e por isso são muito estudados. Os extratos brutos de cultivos de *Aspergillus flavipes* e *A. niveus* por exemplo, foram empregados na hidrólise de cascas de laranja pelas pectinases, para produção

de açúcares utilizados na produção de etanol, obtendo-se 92% da solubilização da casca de laranja (Solís et al., 2009).

E diversos estudos são encontrados na literatura usando extratos brutos contendo pectinases produzidas por fungos aplicadas nos processos de clarificação de sucos de frutas (Nighojkar et al., 2019; Patidar et al., 2018). No tratamento do suco de cajá amarelo usando a pectinase do extrato bruto de *A. niger* IOC 4003, Rocha e colaboradores (2020) obtiveram 36% de clarificação, e redução da turbidez e viscosidade de 41% e 52%, respectivamente; em estudos de Sandri et al. (2013), a clarificação de suco de maçã e mirtilo com a pectinase de *A. niger* LB23, foi igual ou superior as pectinases comerciais, aumentando quase 20% a clarificação do suco de maçã; a aplicação dos extratos brutos de *A. niger* T0005007-2 e *A. oryzae* IPT na clarificação de sucos de maçã, palmito butiá, mirtilo e uva, também apresentou resultados semelhantes ou superiores aos tratamentos com pectinases comerciais (Sandri et al., 2011); os autores de Barman et al. (2015) também estudaram a clarificação de suco de banana com o extrato bruto de *A. niger* à 35 °C, e reportaram um aumento da clarificação do suco de banana de 0,45 de absorvância, juntamente com a redução da turbidez; e a pectinase de *A. foetidus* foi utilizada nos processos de clarificação de suco de manga, onde foi aplicado no teste 20 mL de preparação enzimática bruta, e a clarificação máxima do suco de manga foi de 92,5% na temperatura de 40 °C, e tempo de incubação de 150 min (Kumar et al., 2012).

#### **5.4.1. Efeito do tempo de tratamento para clarificação do suco de manga (Haden) usando a pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus***

Quando diferentes tempos de tratamento foram avaliados na clarificação da polpa de manga (Haden) usando a pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus*, podemos observar que após 1 h de incubação a porcentagem de clarificação a 50 °C atingiu 32,7%, enquanto a 40 °C ficou em torno de 16,5%, e o pico de clarificação foi atingido com 2 h de incubação, onde houve 48,7% (50 °C) e 43,4% (40 °C) de clarificação, sem aumento após 4 h de incubação (**Figura 14**). Portanto, 2 h de incubação é o suficiente para a degradação de toda pectina presente no suco de manga (Haden) pela pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus*, pois não houve diferença com o aumento do tempo de incubação.

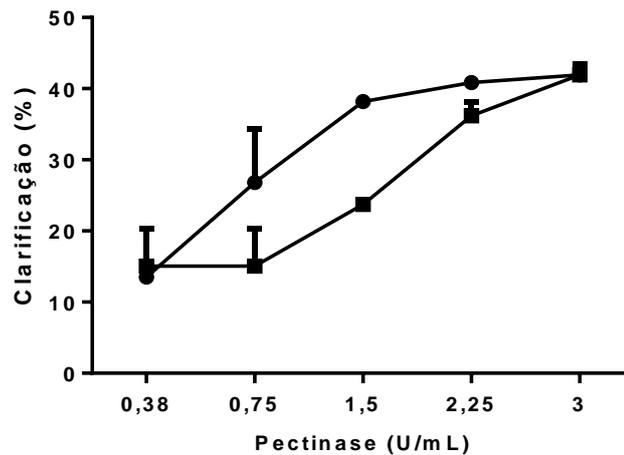


**Figura 14.** Diferentes tempos de tratamento para clarificação do suco de manga (Haden) usando a pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus*. O efeito do tempo de tratamento foi avaliado variando de 30 a 240 min, a 40 °C (●) e 50 °C (■) usando 3 U/mL da enzima. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

Em estudos com *A. niger* foram observadas diferenças significativas quando o tempo foi aumentado de 30 para 60 min, ou seja, o efeito do tempo foi significativo para a enzima bruta no processo de clarificação. À medida que o tempo de incubação foi elevado houve redução na absorbância do suco de banana, o que pode ser explicado pela maior taxa de degradação da pectina com mais tempo de incubação com a enzima (Barman et al., 2015).

#### 5.4.2. Diferentes concentrações da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* na clarificação de suco de manga (Haden)

Diferentes concentrações da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* foram testadas em suco de manga (Haden). Nota-se que com o aumento da quantidade de enzima há também o aumento da porcentagem de clarificação, chegando a 41,9% na concentração de 3 U/mL. Observamos que a clarificação foi melhor a 40 °C em baixas concentrações da enzima, igualando as porcentagens das duas temperaturas em maiores concentrações da enzima (2,25 e 3 U/mL) (**Figura 15**).



**Figura 15.** Diferentes concentrações da pectinase (extrato bruto) de *A. japonicus* na clarificação de suco de manga (Haden). Concentrações de 0,38, 0,75, 1,5, 2,25 e 3 U/mL foram testadas a 40°C (●) e 50°C (■). Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

Resultados semelhantes foram reportados na literatura, onde a clarificação do suco de pera foi elevada com o aumento na concentração da enzima em estudos de Gani et al. (2021), assim como a clarificação de suco de banana em estudos de Barman e colaboradores (2015).

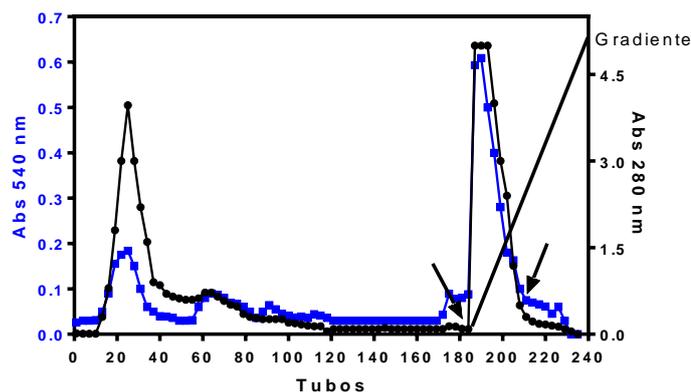
Os resultados obtidos se mostram interessantes pois o extrato bruto contendo pectinases de *A. japonicus* possui propriedades que o tornam eficiente na clarificação de vários tipos de sucos, se tornando excelente candidato para uso na indústria alimentícia, principalmente na indústria de sucos de frutas.

Parte dos resultados obtidos no capítulo 2 com o *A. japonicus* foram submetidos para publicação no artigo intitulado: “Production and biochemical characterization of *Aspergillus japonicus* pectinase using a low-cost alternative carbon source for application in the clarification of fruit juices”.

## 6. CAPÍTULO 2. Purificação, Caracterização e Imobilização da pectinase de *Aspergillus japonicus* e aplicação da enzima na clarificação de sucos de frutas

### 6.1. Purificação da pectinase de *A. japonicus*

O extrato bruto de *A. japonicus* foi purificado em duas colunas cromatográficas, uma coluna de troca iônica (DEAE-fractogel) cujo perfil cromatográfico está representado na **Figura 16**, seguida de uma coluna hidrofóbica (fenil-sepharose). O resultado obtido foi uma semi-purificação com uma atividade específica de 7,9 U/mg proteína, com fator de purificação de 2,9 vezes e rendimento de 81% (**Tabela 5**). A fração do pico 1 da fenil-sepharose contendo a pectinase semi-purificada de *A. japonicus*, uma poligalacturonase (PG - chamada daqui para frente de PGAj), foi então reunida, dialisada e utilizada para as caracterizações posteriores.



**Figura 16.** Perfil cromatográfico da atividade pectinolítica de *A. japonicus* em coluna DEAE-Fractogel. A coluna (2,0 x 9,0 cm) foi equilibrada com tampão Tris.HCl, 10 mM, pH 8,0, e eluída com um gradiente do mesmo tampão com 0-1 M de NaCl. Frações de 3,6 mL foram coletadas por tubo. Proteína 280 nm (●); atividade pectinolítica em Abs 540nm (■).

**Tabela 5.** Purificação da pectinase extracelular de *A. japonicus*

PURIFICAÇÃO	v (mL)	UT	PTN	AE	%	P
Controle	105	370,7	136,5	2,7	100,00	1,0
DEAE-fractogel	81	187,9	44	4,3	51	1,6
Fenil-sepharose	200	300,6	38	7,9	81	2,9

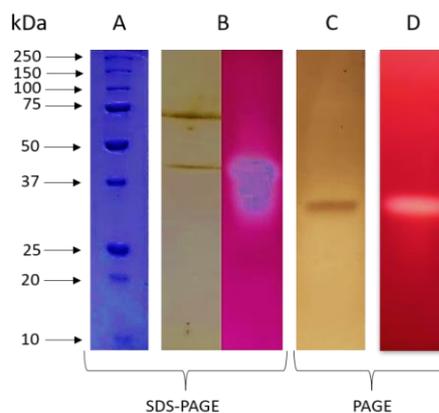
V: Volume da amostra (mL); UT: unidades totais; PTN: miligrama de proteínas totais; AE: atividade específica (U/mg de proteína); %: porcentagem de atividade enzimática; P: fator de purificação.

Várias pectinases fúngicas têm sido purificadas com diferentes métodos e rendimentos. A pectinase de *A. terreus* foi semi-purificada por cromatografia de troca iônica e exclusão molecular, com um rendimento de 80% (Vaz et al., 2020); estudos de Anand et al. (2017) purificaram uma poligalacturonase de *A. niger* com 2 passos, precipitação com acetona e coluna de CM-celulose, obtendo 15,3 vezes de purificação, mas com um rendimento de apenas 1,2%; a pectina metilesterase de *A. tubingensis* foi purificada 20,3 vezes com recuperação de 47,7% em dois passos: CM-Celulose e Sephadex G-100 (Patidar et al., 2017); e a pectina liase de *Aspergillus terricola* foi purificada em cromatografia de troca iônica e gel filtração, com um rendimento de 45% (Yadav et al., 2009).

### 6.1.1. Determinação do grau de pureza da pectinase semi-purificada de *A. japonicus* (PGAj)

#### 6.1.1.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), condições nativas (PAGE) e Zimograma

A PGAj foi analisada em gel SDS-PAGE 15% para verificar sua massa molecular e sua atividade em gel correspondente (**Figura 17B**). A massa molecular da subunidade de PGAj foi de aproximadamente 40 kDa. Através de um zimograma no mesmo gel, foi possível confirmar a presença de pelo menos uma forma de poligalacturonase com alta atividade enzimática (**Figura 17B**). Para verificar a homogeneidade da enzima semi-purificada foi feito um PAGE 10% que revelou uma única banda de proteína (**Figura 17C**). A coloração da atividade da PGAj também foi realizada pela incorporação de pectina cítrica no gel PAGE nativo, onde uma zona clara foi obtida (**Figura 17D**).



**Figura 17.** Perfil eletroforético da pectinase semi-purificada (PGAj). (A) marcador de massa molecular (BioRad 1610363); (B) gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% de PGAj e análise de zimograma (25 µg de cada um); (C)

PAGE 10% (50 µg); (D) zimograma em PAGE 10% (10 µg). Os géis foram corados com nitrato de prata (Blum et al., 1987), o marcador com Coomassie Brilliant Blue (0,1%), e o zimograma com vermelho de rutênio (0,05%).

As massas moleculares de pectinases purificadas de fungos e bactérias variam de 35 kDa a 115 kDa (Vaz et al., 2020). De acordo com Hamdy (2005), tal variação pode ser atribuída ao fato de que as pectinases são glicoproteínas e, portanto, a variação na glicosilação pode levar a um aumento da massa molecular.

Um estudo anterior em *A. japonicus* também utilizando uma coluna de troca iônica, seguida de fenil-sepharose para purificação, mostrou duas poligalacturonases (PG I e II) com massas moleculares de 38 kDa e 65 kDa, respectivamente (Semenova et al., 2003). Estudos em outras espécies de fungos mostraram massas moleculares de pectinases próximas às encontradas no presente estudo, por exemplo: 50 kDa (Vaz et al., 2020), 37 kDa (Cheng et al., 2016; Yuan et al., 2011), 42 kDa (Sassi et al., 2016), 66,2 kDa (Ma et al., 2016), 45 kDa (Tounsi et al., 2016) e 34 a 42 kDa (Barman et al., 2015).

#### 6.1.1.2. Cromatografia líquida com espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)

Na cromatografia líquida com espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) foram encontradas diferentes proporções de 9 pectinases (**Tabela 6**), onde o maior iBAQ e concentração (% de cobertura) encontrados foram da poligalacturonase de *Aspergillus japonicus* CBS 114.51 - XP\_025523629.1 (iBAQ = 9.424.900, 38,1% de cobertura) com peso molecular de 29,99 kDa, e da pectina liase de *Aspergillus japonicus* CBS 114.51 - XP\_025524673.1 (iBAQ = 1.645.400, 27,6% de cobertura) com peso molecular de 34,024 kDa.

**Tabela 6.** Identificação de diferentes pectinases da amostra semi-purificada de *A. japonicus* (LC-MS/MS)

Nome da Proteína	MS dados					Organismo mais próximo
	# pep.	% cob.	PM (kDa)	iBAQ	Prot ID (top hit)	
Poligalacturonase	8	38,1	29,99	9.424.900	XP_025523629.1	<i>Aspergillus japonicus</i> CBS 114.51
Poligalacturonase	5	19,6	38,57	15.395	XP_025502337.1	<i>Aspergillus aculeatinus</i> CBS 121060

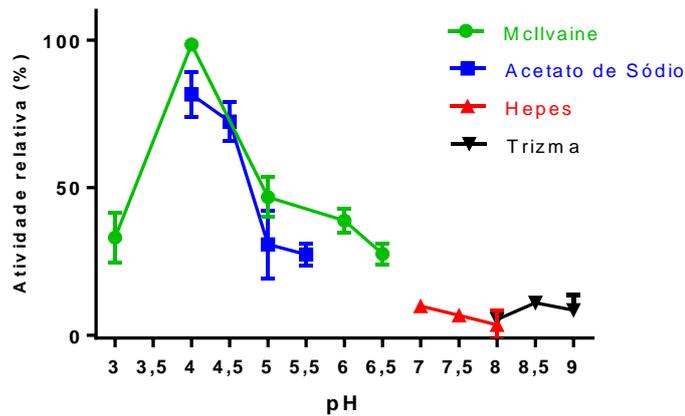
Exo-poligalacturonase	3	10,8	47,43	224.020	XP_025499149.1	<i>Aspergillus aculeatinus</i> CBS 121060
pectina liase	7	27,6	34,02	1.645.400	XP_025524673.1	<i>Aspergillus japonicus</i> CBS 114.51
pectina liase	8	23,2	41,94	775.980	XP_025524524.1	<i>Aspergillus japonicus</i> CBS 114.51
pectina liase	3	5,6	110,28	95.806	XP_025523724.1	<i>Aspergillus japonicus</i> CBS 114.51
Pectinesterase	3	12,4	35,68	875.590	XP_025530183.1	<i>Aspergillus japonicus</i> CBS 114.51
alpha-L-rhamnosidase A	4	6,5	71,33	40.991	XP_025524841.1	<i>Aspergillus japonicus</i> CBS 114.51
Rhamnoga-lacturonato liase A	2	6,1	56,11	20.811	XP_025528748.1	<i>Aspergillus japonicus</i> CBS 114.51

Legenda: # pep. = número de hits de peptídeos únicos; % cob. = porcentagem de cobertura de sequência de aminoácidos de proteínas identificadas; PM (kDa) = peso molecular em kDa; iBAQ = composição molar.

## 6.2. Caracterização bioquímica da PGAj

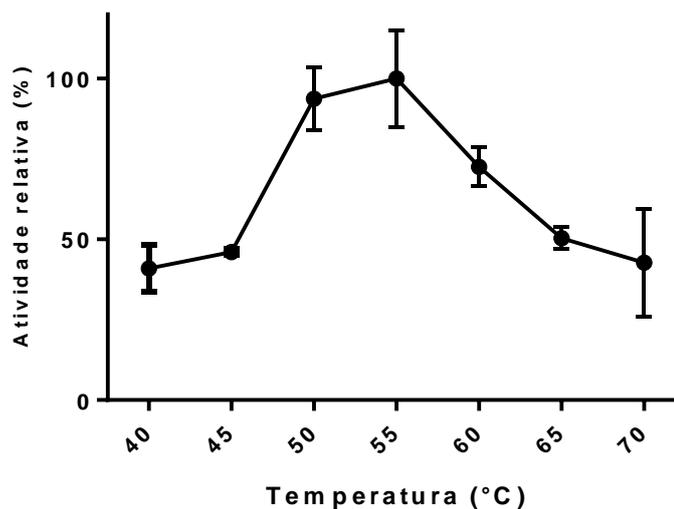
### 6.2.1. Efeito do pH e da temperatura na atividade da PGAj

A enzima semi-purificada apresentou atividade máxima em tampão McIlvaine pH 4,0 e manteve 72% de atividade em pH 4,5. Para os valores abaixo e acima destes observamos uma queda de mais de 50% (**Figura 18**). O pH ótimo do extrato bruto também foi 4, mas em pH de 3-5,5 a enzima ainda manteve 50% da sua atividade, ou seja, a pectinase diminuiu sua tolerância em diferentes pHs após a purificação.



**Figura 18.** Efeito do pH na atividade da PGAj. A atividade foi determinada em diferentes pHs (3,0 – 9,0) utilizando 4 tampões (McIlvaine, acetato de sódio, Hepes e Trizma). As atividades relativas foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

A PGAj teve sua atividade ótima entre 50 e 55 °C, sendo observada uma queda gradual com o aumento da temperatura, assim como em temperaturas menores (**Figura 19**). O extrato bruto de *A. japonicus* teve sua temperatura ótima de 60 a 65 °C, ou seja, após a purificação a temperatura ótima da pectinase diminuiu para 50-55 °C, perdendo 50% da sua atividade a 65 °C.

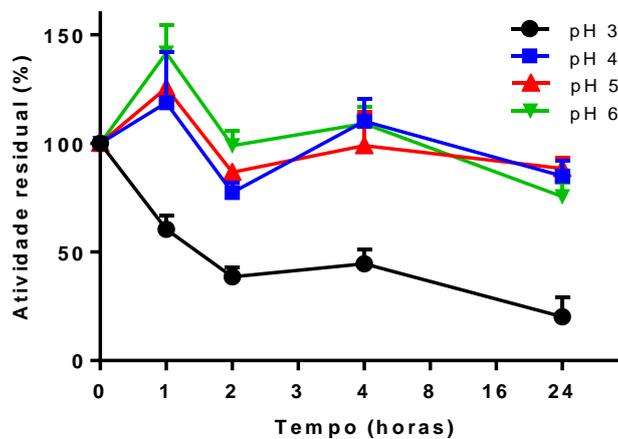


**Figura 19.** Efeito da temperatura na atividade da PGAj. A atividade enzimática foi determinada em temperaturas com variações entre 40 e 70 °C, nas condições ótimas preestabelecidas. As atividades relativas foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

Existem muitos estudos envolvendo caracterização bioquímica de poligalacturonases purificadas de *Aspergillus* sp. que mostram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, tais como: pH 4,0 com *Calonectria pteridis* (Ázar et al., 2020); pH 4,0 e 55 °C com *Aspergillus carbonarius* (Devi & Rao, 1996); pH 4,5 – *Aspergillus kawakii* (Contreras-Esquivel & Voget, 2004); *A. niger* – pH 4,6 (Dinu et al., 2007); pH 3,9 e 50 °C – *Penicillium frequentans* (Chellegatti et al., 2002); pectinases de *A. japonicus* com pHs variando de 4,0 - 5,5 (Semenova et al., 2003).

### 6.2.2. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da enzima

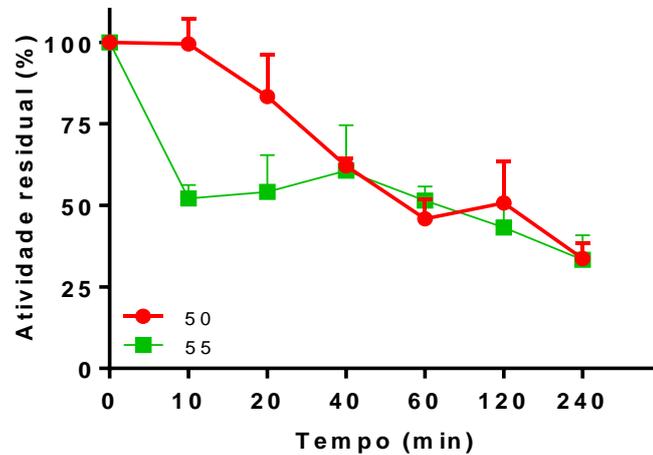
A estabilidade da PGAj foi avaliada em diferentes pHs, sendo observado que a enzima ficou parcialmente estável durante 4 h em pHs 4,0, 5,0 e 6,0, mantendo aproximadamente 75% da atividade após 24 h. Em pH 3,0 a enzima teve uma queda de 40% na atividade após 1 h, e após 24 h ficou com 20% da atividade inicial (**Figura 20**).



**Figura 20.** Efeito do pH na estabilidade da PGAj. A PG foi incubada em pHs variando de 3,0 – 6,0 durante um período de até 24 h. Alíquotas foram retiradas nos tempos indicados para a dosagem de atividade enzimática residual conforme o item 4.4.

Para avaliar os efeitos da temperatura na estabilidade, a enzima foi submetida a ensaios nos quais foi dosada a atividade da PGAj após um período de incubação a 50 e 55 °C (**Figura 21**). Podemos observar que a 50 °C a enzima foi estável, mantendo 83% de atividade durante 20 min, atingindo sua meia-vida após 2 h de incubação, mantendo 33% de atividade após 4 h. A 55 °C, a meia-vida da enzima foi atingida logo nos primeiros 10 min (52%), mantendo a

atividade nessa faixa até 1 h de incubação, posteriormente caindo gradativamente com o aumento no tempo de incubação até atingir 33% após 4 h.



**Figura 21.** Efeito da temperatura na estabilidade da PGAj. A enzima foi incubada a 50 e 55 °C durante um período de até 4 h. Alíquotas foram retiradas nos tempos indicados para a dosagem de atividade enzimática residual conforme o item 4.4. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

Enzimas pectinolíticas fúngicas normalmente apresentam maior estabilidade em meio ácido, como a PGAj. Alguns exemplos são: a exo-poligalacturonase de *Penicillium janthinellum* sw09 que mostrou uma enzima mais estável em pH 6,0, com 90% - 100% da atividade residual, em uma faixa de pH de 4,0 – 8,0 (Ma et al., 2016); a endo-PG de *Penillicium* sp. mostrou-se acidofílica e estável, em uma faixa de pH de 4,0 – 5,0 (Yuan et al., 2011); a endo-PG de *A. awamori* também não foi estável abaixo de pH 4,0 (Nagai et al., 2000); as PGs de *A. japonicus* (PG I e II) foram relativamente instáveis em altas temperaturas, ambas perderam mais de 50% de sua atividade durante 5 min a 50 °C. A 30 °C, a PG II reteve 90% de sua atividade após 3 h de incubação, e a PG I perdeu 40% de sua atividade após 1 h de incubação (Semenova et al., 2003); a PG semi-purificada de *A. terreus* atingiu sua meia-vida com 2 h de incubação a 40 °C (Vaz et al., 2020).

O pH ideal das pectinases fúngicas em uma faixa ácida é uma característica importante para seu uso nas indústrias de sucos, pois segundo Awasthi (2011) a viscosidade de soluções coloidais da pectina diminui na faixa do pH ácido, por isso têm sido estudadas para serem usadas na extração e clarificação de sucos de frutas por diversos autores.

### 6.2.3. Especificidade da PGAj

A enzima teve sua melhor atividade com pectina citrus ( $8,45 \pm 1,6$  U/mg proteína, que foi considerado 100%), seguida da pectina de maçã ( $47\% \pm 21,2$ ) e ácido poligalacturônico ( $20\% \pm 1,2$ ) (Tabela 7). Para todos os outros substratos testados a atividade pectinolítica não foi detectada.

**Tabela 7.** Especificidade ao substrato da PGAj

Substratos (1 %)	Atividade relativa (%) <sup>*</sup>
Pectina citrus	100 <sup>a</sup>
Pectina de maçã	$47 \pm 21.2^b$
Ácido poligalacturônico	$20 \pm 1.2^b$
Xilana de bétula	ND
Xilana de aveia	ND
Amido	ND
Sacarose	ND
Caseína	ND

As dosagens pectinolíticas foram realizadas conforme item 4.4. AR (%): A atividade relativa foi calculada usando a maior atividade enzimática como 100%. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições; e as médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); ND: não detectado.

Alguns estudos na literatura mostram pectinases com diferentes afinidades de acordo com a porcentagem de esterificações dos substratos, como: a PG de *A. awamori* CICC 2040 teve a pectina como o melhor substrato para sua atividade (Adedeji & Ezekiel, 2019); a endo-PG de *Penicillium* sp. mostrou 100% para o ácido poligalacturônico, seguido por pectinas com diferentes níveis de esterificação: 77,5%, 19,4% e 9% de atividade relativa para pectinas de 34%, 70% e 85% de esterificações, respectivamente (Yuan et al., 2011).

### 6.3. Aplicação da PGAj na clarificação de sucos

A capacidade da PGAj em clarificar diferentes sucos de frutas foi avaliada com 13 frutas (Tabela 8). Podemos observar que a melhor clarificação obtida foi com a polpa de suco de

manga (Palmer) (**Figura 22**), onde houve um aumento de 65% na clarificação do suco, cujo resultado foi superior ao obtido usando a pectinase comercial Pectinex (49%). A manga (Tommy) foi clarificada em 41% usando a PGAj, e somente 21% usando a Pectinex. O suco de goiaba branca foi melhor clarificado (40%) a 50 °C com a PGAj, semelhante ao resultado da Pectinex (37%). A banana nanica teve uma porcentagem de clarificação de 11% com a PGAj e 15,6% com a Pectinex. Para maçã gala houve uma clarificação de 9,4% com a PGAj.

No entanto, a acerola e o mamão tiveram baixas porcentagens de clarificação, possivelmente porque estas polpas não são muito viscosas. Também foram testados sucos de guavira, laranja, melão, ponkan, uva isis e uva vitória, mas não houve clarificação, as polpas sem tratamento (controles) tinham quase 100% de transmitância, impossibilitando detecção de clarificação nos tratamentos.

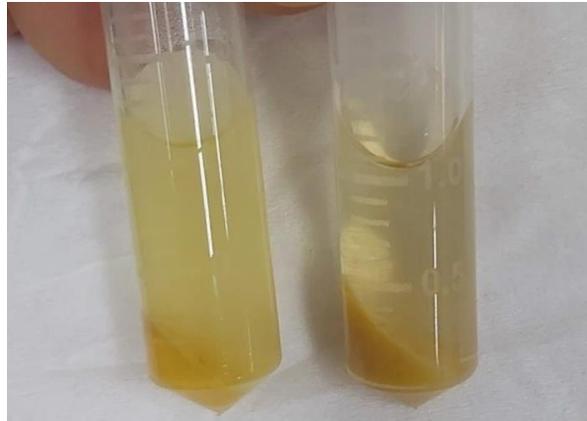
**Tabela 8.** Clarificação de sucos de frutas com a PGAj e pectinase comercial Pectinex

CLARIFICAÇÃO DOS SUCOS DE FRUTAS (%)					
FRUTAS EM NATURA	40 °C		50 °C		pH dos sucos
	PGAj	Pectinex	PGAj	Pectinex	
ACEROLA	2,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	ND	2,2 ± 0,04 <sup>a</sup>	ND	3,5-3,7
BANANA NANICA	10,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	15,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	7,4 ± 0,3 <sup>c</sup>	15,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,8-5,5
GOIABA BRANCA	29,9 ± 2,4 <sup>b</sup>	33,6 ± 1,7 <sup>ab</sup>	40,2 ± 1,3 <sup>a</sup>	37,1 ± 1,0 <sup>ab</sup>	3,7-3,9
MAÇÃ GALA	9,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	ND	5,8 ± 3,9 <sup>a</sup>	ND	4,0-4,3
MAMÃO	1,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	ND	1,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	ND	4,1-5,0
MANGA PALMER	65,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	49,3 ± 1,8 <sup>b</sup>	65,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	51,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	4,1-4,5
MANGA TOMMY	41,1 ± 0,9 <sup>a</sup>	21,2 ± 1,4 <sup>b</sup>	42,7 ± 1,4 <sup>a</sup>	20,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,7-3,9

A clarificação dos sucos de frutas foi feita com 2 mL de polpa de cada fruta e 2 mL da PGAj (3 U/mL totais) e da Pectinex. Legenda: ND - não determinado. Os valores de clarificação (%) foram calculados seguindo Rosmine et al. (2017). PGAj - poligalacturonase semi-purificada de *A. japonicus*; Pectinex - pectinase comercial. Os valores são dados como média ± desvio padrão de 3 repetições e as diferentes letras dentro de cada linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos foram significativamente semelhantes nas duas temperaturas de incubação testadas, com exceção das clarificações obtidas com banana nanica e goiaba branca.

Na **Figura 22**, observa-se a clarificação da polpa de manga (Palmer), quando tratada com a PGAj (direita) comparada com o controle (esquerda).



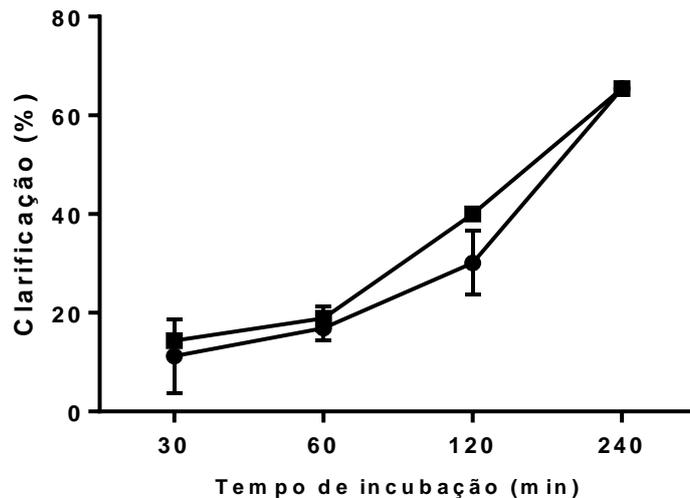
**Figura 22.** Clarificação do suco de manga (Palmer) usando PGAj. A polpa da manga foi extraída e peneirada sem adição de água. Amostras de polpa (2 mL) foram incubadas por 4 h sob agitação (140 rpm) com 3 U/mL de PGAj (1:1, v/v). O mesmo volume de polpa também foi incubado com enzima inativada e utilizado como controle. O suco de controle e tratado com PGAj foram fervidos, centrifugados a 10000 g por 20 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para determinar a claridade do suco, por meio da medida de transmitância (650 nm) utilizando um espectrofotômetro Genesys 10S UV-vis, tomando água destilada como branco.

Vários estudos da ação de enzimas na clarificação de sucos de frutas são reportados na literatura (Ezeh et al., 2023; Garzon et al., 2021; Gani et al., 2021; Rocha et al., 2020; Patidar et al., 2020; Vaz et al., 2020; Nighojkar et al., 2019; Infante, 2019; Adedeji & Ezekiel, 2019; Amin et al., 2019; Cheng et al., 2016), onde são avaliados parâmetros como viscosidade, turbidez, rendimento e clarificação com diferentes metodologias.

O trabalho de Ezeh et al. (2023) reportou a clarificação de suco de maçã onde a pectinase de *Yarrowia phangngaensis* gerou percentuais de redução de turbidez e claridade de 39,33% e 59,84%, respectivamente; estudos de Gani et al. (2021) mostraram uma variação entre 38,80% e 91,10% de clarificação em suco de pera, cujas condições ótimas de processamento para extração assistida por pectinase foram concentração de 1,90% da enzima, temperatura de incubação de 30 °C e tempo de incubação de 120 min; estudos de Sandri & Silveira (2018) reportaram um tratamento enzimático de suco de morango com a pectinase de *A. niger* que reduziu 60% dos níveis de turbidez e 40% na viscosidade das amostras tratadas; uma pectinase imobilizada de *A. aculeatus* para a clarificação do suco de maçã onde houve diminuição da absorvância de 97,22% e de umbu de 45,52% (de Oliveira et al., 2018); uma endopoligalacturonase ácida de *Penicillium oxalicum* que aumentou a transmitância de luz da polpa de mamão em 29,5% (Cheng et al., 2016).

### 6.3.1. Efeito do tempo de tratamento para clarificação do suco de manga (Palmer) usando a PGAj

No tratamento da polpa de manga (Palmer) em diferentes tempos de tratamento usando a PGAj podemos observar que com 2 h de incubação houve entre 30 e 40% de clarificação, chegando a 65% após 4 h (**Figura 23**).



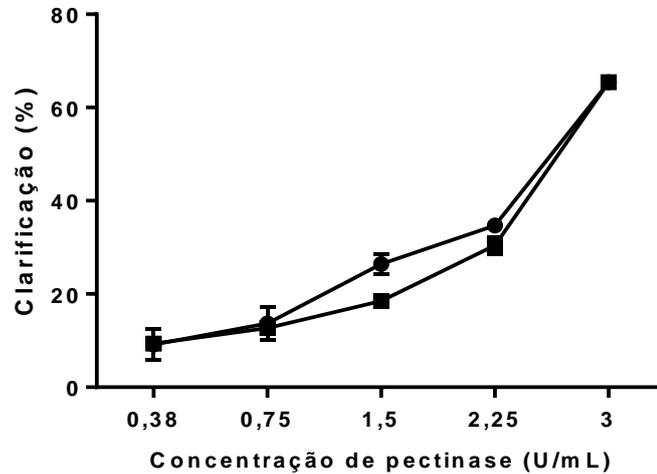
**Figura 23.** Diferentes tempos de tratamento para clarificação do suco de manga (Palmer) usando a PGAj. O efeito do tempo de tratamento foi avaliado variando de 30 a 240 min a 40 °C (●) e 50 °C (■) usando 3 U/mL da enzima. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

Um estudo semelhante, com diferentes tempos para o tratamento de suco de banana, com a pectinase parcialmente purificada de *A. niger*, teve o melhor resultado com 60 min de incubação, porém o resultado não mostrou diferença significativa do tratamento de 30 min (Barman et al., 2015), semelhante ao resultado do presente estudo. Portanto, para Barman e colaboradores, o aumento do tempo de incubação não teve efeito significativo no processo de clarificação até 60 min. No entanto, nossos resultados demonstraram que com mais tempo houve uma melhor clarificação do suco de manga (Palmer), triplicando a porcentagem obtida.

### 6.3.2. Diferentes concentrações da PGAj na clarificação de suco de manga (Palmer)

Na avaliação da influência da concentração de enzima, nota-se que com o aumento da concentração há também o aumento da porcentagem de clarificação, chegando a 65% na

concentração de 3 U/mL. Não houve diferença significativa quando usado 40 ou 50 °C nos testes. (Figura 24).



**Figura 24.** Diferentes concentrações da PGAj na clarificação de suco de manga (Palmer). Concentrações de 0,38, 0,75, 1,5, 2,25 e 3 U/mL foram testadas a 40 °C (●) e 50 °C (■) durante 4 h de incubação. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

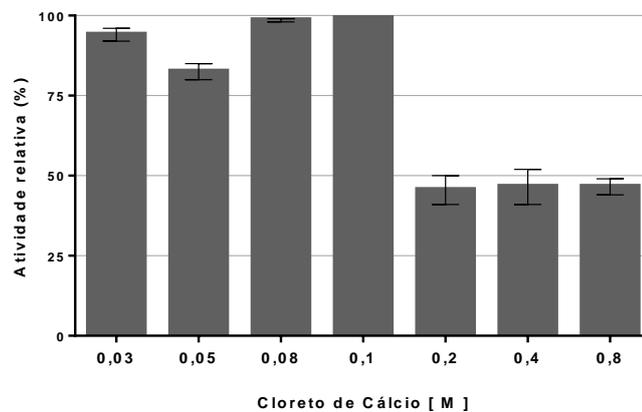
Semelhante ao resultado obtido no presente estudo, a clareza do suco de pera aumentou significativamente com o aumento na concentração da pectinase em estudos de Gani et al. (2021); a PG de *A. niger* AN07 aumentou a clarificação do suco de romã de 6,8% para 24,6% a 30 °C, com o aumento na concentração de PG de 0 para 80 U (Patidar et al., 2020); Sudeep et al. (2020) também aumentaram a transmitância do suco de laranja com o aumento da concentração de pectinase (0%; 0,25%; 0,5%; 0,75%; 1%); a influência da concentração de enzima também foi demonstrada na clarificação de suco de pitaita, onde houve uma redução significativa da turbidez e da viscosidade com o aumento da concentração de pectinase (Minh, 2020).

#### 6.4. Imobilização da PGAj usando alginato de cálcio

##### 6.4.1. Efeito da concentração de CaCl<sub>2</sub> na imobilização da PGAj

A imobilização da PGAj foi obtida com baixas concentrações de cloreto de cálcio, atingindo um pico com 0,1 M, decaindo em concentrações superiores (Figura 25).

As propriedades gelificantes do alginato de sódio são baseadas nas interações com íons multivalentes. Entre os diferentes íons, o  $\text{Ca}^{2+}$  tem a maior afinidade pela solução com o alginato. A ligação iônica formada para este íon e os grupos carboxílicos do alginato de sódio levam a formação mecanicamente estável de redes do gel alginato por um processo auto-cooperativo com um vizinho próximo (de Oliveira et al., 2018). Devido a esse mecanismo os efeitos da concentração do  $\text{CaCl}_2$  e de alginato de sódio na imobilização da pectinase foram estudados.



**Figura 25.** Efeito de diferentes concentrações de cloreto de cálcio na imobilização da PGAj. A reação foi realizada com alginato de sódio 4% em concentrações de 0,03 - 0,8 M de  $\text{CaCl}_2$ , em temperatura ambiente, durante 2 h sob agitação. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

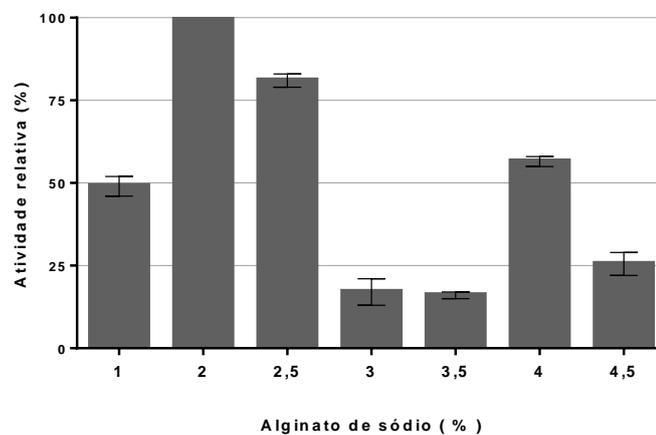
Os resultados na literatura sobre o efeito da concentração de  $\text{CaCl}_2$  na imobilização de enzimas são diversos. Resultados semelhantes ao encontrado neste estudo foram reportados por de Oliveira et al. (2018), onde foi demonstrado que menores concentrações de  $\text{CaCl}_2$  resultaram em melhores rendimentos na imobilização da pectinase de *Aspergillus aculeatus*. Para a endoxilanase de *Geobacillus stearothermophilus*, 0,4 M de  $\text{CaCl}_2$  foi a melhor concentração (Bibi et al., 2015) e a pectinase de *B. licheniformis* teve melhor imobilização com 0,2 M de  $\text{CaCl}_2$  (Rehman et al., 2013).

#### 6.4.2. Efeito da concentração de alginato de sódio na imobilização da PGAj

A melhor concentração para imobilização da PGAj foi 2% de alginato de sódio, usando 0,1 M de  $\text{CaCl}_2$  (**Figura 26**). Resultado semelhante foi reportado por de Oliveira e colaboradores (2018), onde a melhor concentração de alginato de sódio para imobilização da

pectinase de *A. aculeatus* foi 1,5%. Bibi et al. (2015) tiveram 4% como a melhor concentração para a imobilização da endo-xilanase de *G. stearothermophilus*, onde observamos semelhança também como o resultado obtido neste estudo em concentrações mais altas.

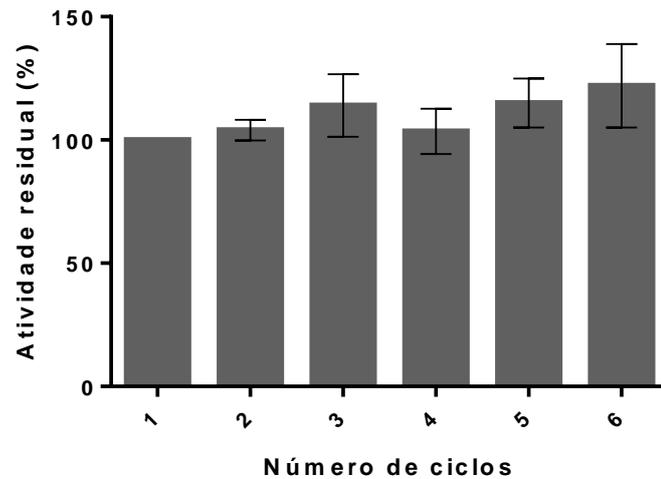
A determinação da concentração adequada de alginato de sódio é fundamental para maximizar o rendimento e efetividade da imobilização, pois quanto maior a concentração de alginato de sódio menores serão os poros do alginato de cálcio formado, dificultando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima aprisionada. No entanto, uma baixa concentração pode resultar em esferas macias e frágeis com poros largos que facilitam a lixiviação da enzima na etapa de lavagem (de Oliveira et al., 2018).



**Figura 26.** Efeito de diferentes concentrações de alginato de sódio na imobilização da PGAj. A reação foi feita com concentrações de alginato de sódio de 1 - 4,5% com 0,1 M de  $\text{CaCl}_2$ , em temperatura ambiente, durante 2 h sob agitação. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

#### 6.4.3. Reuso da PGAj imobilizada

A PGAj imobilizada manteve 100% de atividade após 6 ciclos de reação usando pectina 1% como substrato, conforme mostrado na **Figura 27**. A reutilização de uma enzima é um fator chave para seu custo-benefício industrial por ser um dos parâmetros que determina a viabilidade financeira de um bioprocessamento (de Oliveira et al., 2018).



**Figura 27.** Reuso da PGAj imobilizada. AR (%): A atividade residual foi calculada usando o primeiro ciclo como 100%. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

O resultado do presente estudo se mostra melhor que o da pectinase de *A. aculeatus* que perdeu 20% da sua atividade no terceiro ciclo de reuso e 70% após a oitava repetição (de Oliveira et al., 2018).

Os resultados obtidos se mostram interessantes pois a PG de *A. japonicus* possui propriedades que a tornam eficiente na clarificação de vários tipos de sucos, se tornando excelente candidata para uso na indústria alimentícia.

Parte dos resultados obtidos no capítulo 2 com o *A. japonicus* foram publicados no artigo intitulado “Polygalacturonase from *Aspergillus japonicus* (PGAj): Enzyme production using low-cost carbon source, biochemical properties and application in clarification of fruit juices” que está em anexo ao final desta tese e também pode ser através do link <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878818121003297?via%3Dihub>.

## 7. CAPÍTULO 3. Produção, purificação e caracterização da pectinase de *Thermoascus aurantiacus*

### 7.1. Produção de pectinase por *T. aurantiacus* usando diferentes substratos de baixo custo – cultivo submerso (SC) e em estado sólido (SSC)

Analisando os resultados de produção de pectinase por *T. aurantiacus* podemos observar que a produção foi muito maior em SSC do que em SC (**Tabela 9**). Em SC a casca de maracujá ( $0,26 \pm 0,03$  U/mL) e a erva-mate de tereré grossa ( $0,22 \pm 0,02$  U/mL) foram as melhores indutoras de produção da enzima. As melhores fontes de carbono em SSC foram a palha de milho (28,2 U/g de substrato seco ou  $2,82 \pm 0,01$  U/mL), seguida da farinha de mandioca de Rondonópolis/MT (26,7 U/g de substrato seco ou  $2,67 \pm 0,09$  U/mL), farinha de mandioca grossa do Pará (19,1 U/g de substrato seco ou  $1,91 \pm 0,54$  U/mL), erva-mate fina de chimarrão usada ( $16,7$  U/g de substrato seco ou  $1,67 \pm 0,10$  U/mL), farinha de mandioca de Furnas do Dionísio/MS e farinha de trigo ( $14,8$  U/g de substrato ou  $1,48 \pm 0,37$  U/mL). Destacamos a boa produção de pectinase por *T. aurantiacus* usando farinha de mandioca de Rondonópolis/MT e erva-mate fina de chimarrão usada, que são fontes regionais. A farinha de mandioca de Rondonópolis/MT foi o substrato selecionado para dar continuidade no trabalho.

**Tabela 9.** Produção de pectinase por *T. aurantiacus* usando diferentes substratos de baixo custo

SUBSTRATOS	Cultivo submerso		Cultivo em estado sólido
	Agitado	Estacionário	
	U/MI	U/mL	U/g de substrato seco
1- CL	$0,05 \pm 0,05^{gh}$	$0,00 \pm 0,00$	Nd
2- BL	$0,02 \pm 0,01^{gh}$	$0,02 \pm 0,01^{bcd}$	Nd
3- CM	$0,26 \pm 0,03^a$	$0,02 \pm 0,00^{bcd}$	$0,3 \pm 0,04^f$
4- CEL	$0,20 \pm 0,02^{abcd}$	$0,002 \pm 0,00^d$	$11,2 \pm 0,17^{bcde}$
5- EMFC	$0,11 \pm 0,01^{efg}$	$0,05 \pm 0,01^{abcd}$	$4,7 \pm 0,02^{ef}$

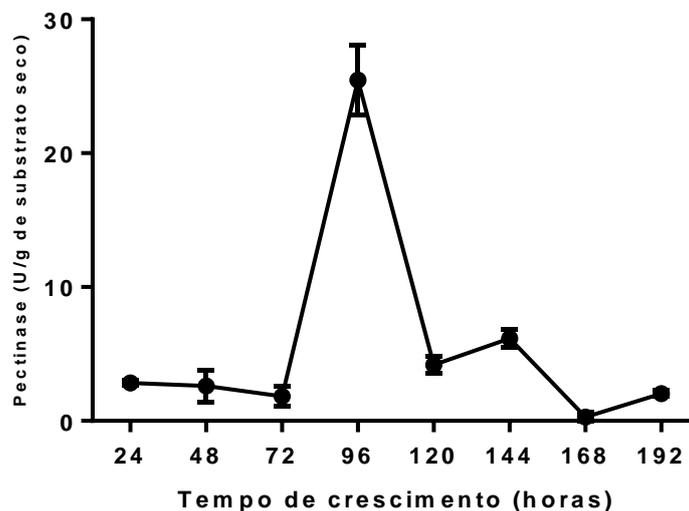
6- EMTMF	0,00 ±0,00 <sup>h</sup>	0,08 ±0,11 <sup>abc</sup>	11,2 ±0,32 <sup>bcde</sup>
7- EMTG	0,22 ±0,02 <sup>ab</sup>	0,05 ±0,02 <sup>abcd</sup>	7,0 ±0,12 <sup>def</sup>
8- EMFCUS	0,12 ±0,02 <sup>cdefg</sup>	0,06 ±0,02 <sup>abcd</sup>	16,7 ±0,10 <sup>bc</sup>
9- EMTMFUS	0,14 ±0,03 <sup>bcdef</sup>	0,08 ±0,01 <sup>abc</sup>	2,2 ±0,01 <sup>ef</sup>
10- EMTGUS	0,17 ±0,03 <sup>abcde</sup>	0,06 ±0,01 <sup>abcd</sup>	10,2 ±0,19 <sup>bcde</sup>
11- FFD	0,00 ±0,00	0,03 ±0,02 <sup>bcd</sup>	14,8 ±0,37 <sup>bcd</sup>
12- FR	0,07 ±0,02 <sup>fgh</sup>	0,02 ±0,01 <sup>bcd</sup>	26,7 ±0,09 <sup>a</sup>
13- FGP	0,00 ±0,00	0,04 ±0,07 <sup>abcd</sup>	19,1 ±0,54 <sup>ab</sup>
14- FGC	0,05 ±0,02 <sup>fgh</sup>	0,02 ±0,01 <sup>bcd</sup>	3,9 ±0,02 <sup>ef</sup>
15- FM	0,00 ±0,00	0,06 ±0,02 <sup>abcd</sup>	0,01 ±0,00 <sup>f</sup>
16- FGCSA	0,20 ±0,02 <sup>abcde</sup>	0,05 ±0,01 <sup>abcd</sup>	4,1 ±0,08 <sup>ef</sup>
17- FT	0,11 ±0,01 <sup>cdefg</sup>	0,10 ±0,02 <sup>a</sup>	14,8 ±0,44 <sup>bcd</sup>
18- G	0,21 ±0,02 <sup>abc</sup>	0,00 ±0,00	Nd
19- BCE	0,00 ±0,00	0,01 ±0,01 <sup>cd</sup>	0,5±0,01 <sup>f</sup>
20- PM	0,03 ±0,00 <sup>gh</sup>	0,08 ±0,04 <sup>ab</sup>	2,82 ±0,01 <sup>a</sup>
21- FS	Nd	Nd	7,4 ±0,05 <sup>cdef</sup>
CV (%)	19,57	38,26	21,47

O *T. aurantiacus* foi crescido em SC por 96 h e em SSC por 120 h, ambos a 40 °C. Abreviações dos substratos (1%): casca de laranja em pó (1-CL); bagaço de laranja em pó (2-BL); casca de maracujá em pó (3-CM); casca extrusada de laranja (4-CEL); erva-mate fina de chimarrão (5-EMFC); erva-mate de tereré média fina (6-EMTMF); erva-mate de tereré grossa (7-EMTG); erva-mate fina de chimarrão usada (8-EM5US); erva-mate de tereré média fina usada (9-EM6US); erva-mate de tereré grossa usada (10-EM7US); farinha de mandioca de Furnas do Dionísio/MS (11-FFD); farinha de mandioca de Rondonópolis/MT (12-FR); farinha de mandioca grossa do Pará (13-FGP); farinha de mandioca grossa Cuiabana/MT (14-FGC); farinha de milho (15-FM); farinha de mandioca grossa Cruzeiro do Sul/Acre (16-FGCSA); farelo de trigo (17-FT); glicose (18-G); bagaço de cana explodido (19-BCE); palha de milho (20-PM) e farinha de soja (21-FS). Legenda: Nd – atividade não determinada. Os valores são médias ± desvios padrão de 3 repetições, e as médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Martins et al. (2002, 2006, 2007, 2012) usaram diversos substratos de baixo custo como, casca de laranja, casca de maracujá, bagaço de laranja, farelo de trigo, resíduo líquido de suco de laranja e pectina cítrica para produção de poligalacturonases em SC e SSC por *T. aurantiacus*; casca de maracujá triturada e película da amêndoa de caju em SSC também foram reportadas como substrato para produção de poligalacturonase por *T. aurantiacus* (Pinto et al., 2006). O fungo termofílico *A. fumigatus* foi isolado de casca de laranja, crescido em SSC com farelo de trigo para produção de pectinase e poligalacturonase também a 50 °C (Phutela et al., 2005). Farelo de trigo e bagaço de laranja foram usados para produzir poligalacturonase por *Thermomucor indicae-seudaticae* em SC e SSC (Martin et al., 2010) e por *Rhizomucor pusillus* em SC (Trindade et al., 2016).

## 7.2. Efeito do tempo de crescimento para produção de pectinase por *T. aurantiacus*

A curva de tempo de crescimento do *T. aurantiacus* mostrou um pico de produção da enzima em 96 h de cultivo usando farinha de Rondonópolis/MT como substrato em SSC, a 40 °C, com uma atividade de  $25,45 \pm 0,60$  U/g de substrato seco (**Figura 28**).



**Figura 28.** Efeito do tempo de crescimento para produção de pectinase por *T. aurantiacus*. O fungo cresceu em SSC contendo farinha de mandioca de Rondonópolis/MT como substrato em condição estacionária a 40 °C por um período variando de 24 a 192 h. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

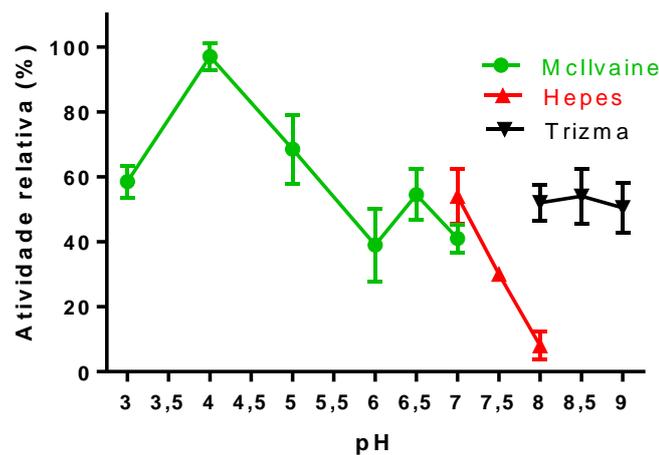
A exo-poligalacturonase de *R. pusillus* também teve sua maior produção em 96 h de cultivo (Trindade et al., 2016); *T. aurantiacus* de Martins et al. (2002) teve produção máxima

de poligalacturonase entre 72 e 96 h de cultivo com pectina comercial e 120 h de cultivo com resíduo de suco de laranja; e *A. fumigatus* produziu pectinases com 48 - 72 h de crescimento (Phutela et al., 2005).

### 7.3. Caracterização bioquímica da pectinase de *T. aurantiacus*

#### 7.3.1. Efeito do pH na atividade da pectinase

A pectinase de *T. aurantiacus* apresentou atividade máxima em tampão McIlvaine pH 4,0 (**Figura 29**), e manteve aproximadamente 50% de atividade até o pH 9,0. Uma vez que a enzima suporta ampla faixa de pH, do ácido ao alcalino, esta poderia ser uma excelente candidata para diversas aplicações.

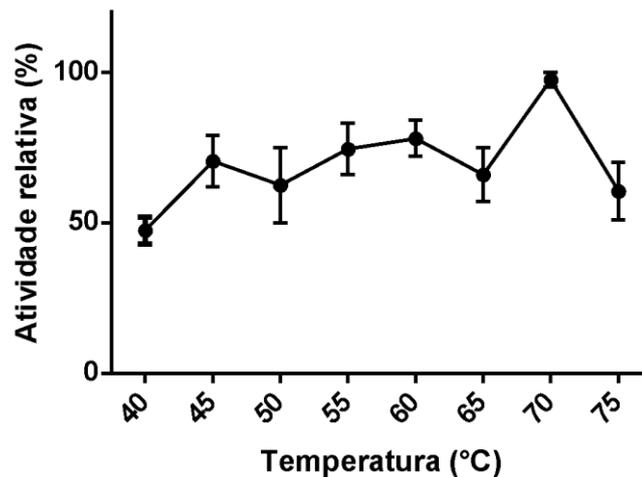


**Figura 29.** Efeito do pH na atividade da pectinase de *T. aurantiacus*. A atividade foi determinada em diferentes pHs (3,0 – 9,0) utilizando 3 tampões (McIlvaine, HEPES e Trizma), nas condições ótimas preestabelecidas a 50 °C. As atividades relativas foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

Pectinases produzidas por fungos termófilos com resultados semelhantes são estudadas por diversos autores: *R. pusillus* – pH 4,5 (Trindade et al., 2016); *A. fumigatus* – pH 4,0 (pectinase) e pH 5,0 (poligalacturonase) (Phutela et al., 2005); pH 5,0 para PG de *Thermomucor indicae-seudaticae*, e pectina liase e exo-PG de *T. aurantiacus* 179-5 (Martin et al., 2010; Martins et al., 2012).

### 7.3.2. Efeito da temperatura na atividade da pectinase de *T. aurantiacus*

A temperatura ótima da pectinase de *T. aurantiacus* foi 70 °C, mantendo ainda 50% de atividade em todas as outras temperaturas testadas (**Figura 30**). Este resultado se mostra muito interessante pois o uso de enzimas em processos industriais pode exigir que as reações sejam conduzidas em altas temperaturas a fim de melhorar a produtividade e reduzir a contaminação microbiana (Ortega et al., 2004). Com isso, altas temperaturas são comumente empregadas em vários processos industriais para diferentes propósitos, e na maioria desses processos, o material submetido ao aquecimento precisa ser resfriado antes do tratamento enzimático. Assim, o uso de pectinases tolerantes em altas temperaturas como a pectinase de *T. aurantiacus*, poderiam eliminar a etapa de resfriamento, diminuindo os custos finais do processo (Brienzo et al., 2009).

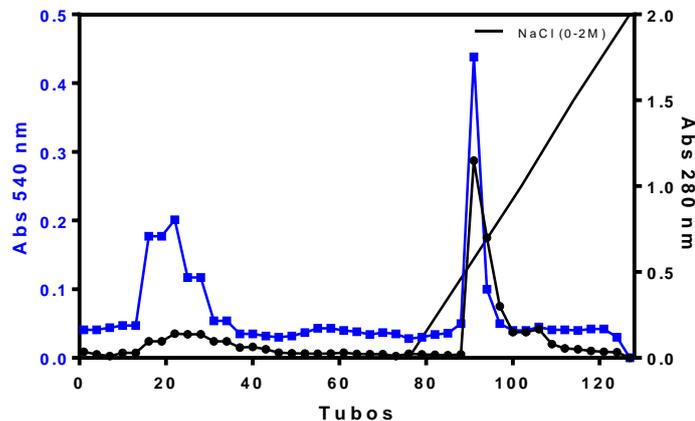


**Figura 30.** Efeito da temperatura na atividade da pectinase de *T. aurantiacus*. A atividade enzimática foi determinada usando tampão McIlvaine pH 4,0 em temperaturas entre 40 e 75 °C, nas condições ótimas preestabelecidas. As atividades relativas foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima. Os valores são médias  $\pm$  desvios padrão de 3 repetições.

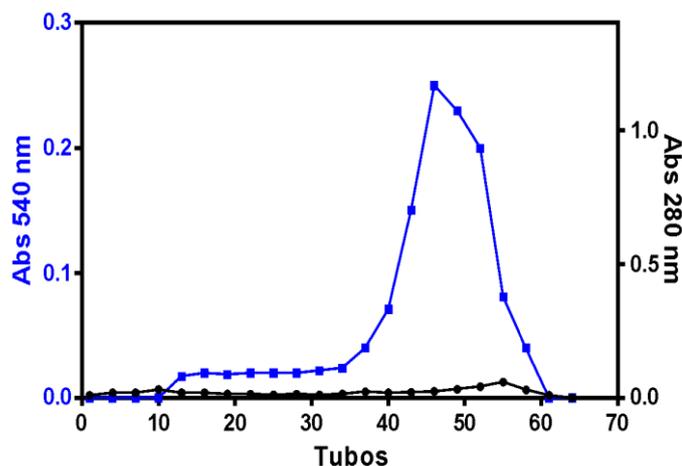
Existem muitos estudos de caracterização bioquímica de pectinases de termófilos que mostram temperaturas ótimas na faixa de 50 - 80 °C (Vieille & Zeikus, 2001), por exemplo as poligalacturonases de *R. pusillus* e de *T. aurantiacus* tiveram sua atividade ótima a 60 °C (Trindade et al., 2016; Martins et al., 2012).

#### 7.4. Purificação enzimática da pectinase de *T. aurantiacus*

Um volume de 49 mL de extrato bruto contendo a pectinase extracelular de *T. aurantiacus* foi aplicado em uma coluna de troca iônica DEAE-fractogel (2,0 x 11,0 cm) equilibrada com tampão Tris.HCl 10 mM pH 8,0, cujo perfil cromatográfico está representado na **Figura 31**. Assim, o pico 2 contendo a maior parte da atividade da pectinase foi aplicado em coluna de filtração Sephacryl S-200 (1,0 x 86 cm) equilibrada com tampão Tris.HCl 50 mM pH 7,0 contendo 150 mM de NaCl (**Figura 32**), cujo resultado obtido foi uma purificação com uma atividade específica de 75,7 U/mg proteína, com fator de purificação de 10 vezes e rendimento de 21% (**Tabela 10**).



**Figura 31.** Perfil cromatográfico da pectinase de *T. aurantiacus* em coluna DEAE-Fractogel. A coluna (2,0 x 11,0 cm) foi equilibrada com tampão Tris.HCl 10 mM pH 8,0 e eluída com um gradiente do mesmo tampão com 0-2 M de NaCl. Frações de 3,6 mL foram coletadas por tubo. Proteínas 280 nm (●); atividade pectinolítica (■).



**Figura 32.** Perfil cromatográfico da pectinase de *T. aurantiacus* em coluna Sephacryl S-200. A coluna (1,0 x 86 cm) foi equilibrada com tampão Tris.HCl 50 mM pH 7,0 contendo 150 mM de NaCl e eluída no mesmo tampão. Frações de 3,2 mL foram coletadas por tubo. Proteína 280 nm (●); atividade pectinolítica (■).

**Tabela 10.** Purificação da pectinase de *T. aurantiacus*

<b>PURIFICAÇÃO</b>	<b>v (mL)</b>	<b>UT</b>	<b>PTN</b>	<b>AE</b>	<b>%</b>	<b>P</b>
<b>Controle</b>	49	82,7	10,83	7,6	100	1,0
<b>DEAE-Fractogel</b>	31	47,4	1,08	44,0	57,3	5,8
<b>Sephacryl S-200</b>	29	17,4	0,23	75,7	21,0	10,0

V: Volume da amostra (mL); UT: unidades totais de atividade enzimática; PTN: proteínas totais; AE: atividade específica (U/mg de proteína); %: porcentagem de atividade enzimática; P: fator de purificação.

Testes para avaliar o grau de pureza da enzima poderão ser feitos futuramente e posteriormente caracterização e aplicação da pectinase na clarificação de sucos de frutas.

## 8. CONCLUSÃO

Neste estudo, a pectinase de *Aspergillus japonicus* e *Thermoascus aurantiacus* foram produzidas utilizando resíduos/produtos agroindustriais (casca de maracujá e farinha de mandioca de Rondonópolis/MT como substrato, respectivamente), reduzindo assim o custo de produção. E ambos os fungos mostraram melhores rendimentos de produção em meio sólido quando comparado ao meio líquido.

A pectinase de *A. japonicus* foi produzida de forma rápida, e a enzima produzida foi estável em diversas faixas de pH (principalmente na faixa de pHs ácidos) e imobilizada com sucesso em alginato de cálcio.

Além disso, a pectinase de *A. japonicus* apresentou melhores resultados na clarificação de sucos de frutas quando comparada à enzima comercial (Pectinex), tornando-a uma excelente candidata para utilização na indústria alimentícia, principalmente na indústria de vinhos e sucos de frutas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOAGYE, D.; BANADDA, N.; KIGGUNDU, N.; KABENGE, I. Assessment of orange peel waste availability in Ghana and potential bio-oil yield using fast pyrolysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 70, p. 814-821, 2017.
- ADEDEJI, O. E.; EZEKIEL, O. O. Pretreatment of selected peels for polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* CICC 2040: purification and application in mango juice extraction. *Bioresource Technology Reports*, v. 7, p. 100306., 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100306>.
- 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, 2015.
- AMANDE, T.; ADEBAYO-TAYO, B.; NDUBUISI-NNAJI, U.; ADO, B. Production and partial characterization of pectinases from mango peels by *Aspergillus tamaris*. *JMBFS*, v. 3, n. 1, p. 59-62, 2013.
- AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases — A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 122, p. 1017-1026, 2019.
- ANAND, G.; YADAV, S.; YADAV, D. Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 suitable for clarification of orange juice. *3 Biotech*, v. 7, n. 2, p. 122, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0760-3>
- ÁZAR, R. I. S. L.; MORALES, M. L.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; FALKOSKI, D. L.; ALFENAS, F. R.; GUIMARÃES, V. M. *Food and Bioproducts Processing*, v. 119, p. 238-245, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.11.013>
- AWASTHI, R. Selection of pectin as pharmaceutical excipient on the basis of rheological behavior. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 3, p. 229, 2011.
- BARMAN, S.; SIT, N.; BADWAIK, L. S.; DEKA, S. C. Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice. *Journal of food science and technology*, v. 52, n. 6, p. 3579-3589, 2015.
- BEZUS, B.; GARMENDIA, G.; VERO, S.; CAVALITTO, S.; CAVELLO, I. Yeasts from the Maritime Antarctic: Tools for industry and bioremediation. *Antarctic Science*, v. 34, n. 1, p. 16-28, 2022. <https://doi.org/10.1017/S0954102021000420>.
- BIBI, Z.; UL QADER, S. A.; AMAN, A. Calcium alginate matrix increases the stability and recycling capability of immobilized endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-IB29. *Extremophiles*, v. 19, 819-827, 2015.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*, v. 8, p. 93-95, 1987.

BRIENZO, M.; ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. Fungal biology reviews, v. 2, p. 120-130, 2009.

CAVALIERI DE ALENCAR GUIMARÃES, NELCIELE; GLIENKE, N. N.; GALEANO, R. M. S.; RULLER, R.; ZANOELO, F. F.; MASUI, D. C.; GIANNESI, G. C. Polygalacturonase from *Aspergillus japonicus* (PGAj): Enzyme production using low-cost carbon source, biochemical properties and application in clarification of fruit juices. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v.39, p.102233, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102233>

CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 100, p. 2567-2577, 2016.

CHELLEGATTI, M., FONSECA, M.J.V, SAID, S. Purification and partial characterization of exopolygalacturonase I from *Penicillium frequentans*. Microbiol Res, v. 157, p. 19-24, 2002.

CHENG, Z., CHEN, D., LU, B., WEI, Y., XIAN, L., LI, Y., HUANG, R. A novel acid-stable endo-polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028: purification, characterization, and application in the beverage industry. Journal of Microbiology Biotechnology, v. 26, n. 6, p. 989-998, 2016.

COLOGNA, N. D. M. D.; GÓMEZ-MENDOZA, D. P.; ZANOELO, F. F.; GIANNESI, G. C.; GUIMARÃES, N. C. A.; MOREIRA, L. R. D. S.; FILHO, E. X. F.; RICART, C. A. O. Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: Proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. Enzyme and Microbial Technology, v. 109, p. 1-10, 2018.

CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C.; VOGET, C.E. Purification and partial characterization of an acid polygalacturonase from *Aspergillus kawakii*. Journal of Biotechnology, v. 110, p. 21-28, 2004.

CRUICKSHANK, R. H.; WADE, G. C. Detection of pectic enzymes in pectinacrylamide gels. Anal Biochem, v. 107, p. 177-81, 1980.

DAL MAGRO, L., KORNECKI, J. F., KLEIN, M. P., RODRIGUES, R. C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Optimized immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* following different protocols: Improved stability and activity under drastic conditions. International Journal of Biological Macromolecules, v. 138, p. 234-243, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.092>

DAVIS, B. J. Disc electrophoresis II. Methods and application to human serum proteins. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 121, p. 404-427, 1964. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x>

DE LUCAS, R.C., OLIVEIRA, T.B., LIMA, M.S., PASIN, T.M., SCARCELLA, A.S.A., PRADE, R.A., SEGATO, F., POLIZELI, M.L.T.M. Effect of enzymatic pretreatment of sugarcane bagasse with recombinant hemicellulases and esterase prior to the application of the cellobiohydrolase CBH I Megazyme. Biomass Conversion and Biorefinery, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00719>

DE OLIVEIRA, R. L., DIAS, J. L., DA SILVA, O. S., PORTO, T. S. Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor. *Food and bioproducts processing*, v.109, p. 9-18, 2018.

DEVI, N.A, RAO, A.G.A. Fractionation, purification and preliminary characterization of polygalacturonases produced by *Aspergillus carbonarius*. *Enzyme Microb Technol*, v. 1996, n. 18, p. 59-65, 1996.

DÍAZ, A. B., DE ORY, I., CARO, I., BLANDINO, A. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. *Food and Bioproducts Processing*, v. 90, p. 72-78, 2011.

DINU, D., NECHIFOR, M.T., STOIAN, G., COSTACHE, M., DINISCHIOTU, A. Enzymes with new biochemical properties in the pectinolytic complex produced by *Aspergillus niger* MIUG 16. *J Biotechnol*, v. 131, p. 128-37, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.06.005>

EJAZ, U.; HANIF, H.; SOHAIL, M. Two layered strategy for cost effective production of pectinase: immobilization of yeast and utilization of crude substrate. *Heliyon*, v. 6, e05456, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05456>

EVANGELISTA, D. E. Estudos funcionais e estruturais de pectinases e xilanases com potencial para aplicações biotecnológicas. 157 p. Tese (doutorado), Instituto de física de São Carlos. Programa de Pós- Graduação em Física, Universidade de São Paulo, 2017.

EZEH, N. O., NWAGU, T. N. T., AMADI, O. C., OKOLO, B., MONEKE, A., AGU, R. Extracellular pectinase production from a novel *Yarrowia phangngaensis* XB3 grown on banana waste and its application in fruit juice clarification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 47, p. 102614, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102614>

FAVELA-TORRES, E.; AGUILER, C. N.; CONTRARA-EQUIVEL, J. C.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Pectinase. In: Pandey A., Webb C., Soccol C.R., Larroche C. (eds) *Enzyme technology*. Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India, p. 265-267, 2005.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. agrotec.*, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

FERREIRA, L. L.; DALL'ANTONIA, C. B.; SHIGA, E. A.; ALVIM, L. J.; PESSONI, R. A. B. Sugarcane bagasse as a source of carbon for enzyme production by filamentous fungi. *Hoehnea*, v. 45, n 1, p. 134-142, 2018.

FLORES-FERNÁNDEZ, C. N.; CÁRDENAS-FERNÁNDEZ, M.; LYE, G. J.; WARD, J. M. Synergistic action of thermophilic pectinases for pectin bioconversion into D-galacturonic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 160, p. 110071, 2022.

GANI, G., NAIK, H. R., JAN, N., BASHIR, O., HUSSAIN, S. Z., RATHER, A. H., RESHI, M., AMIN, T. Physicochemical and antioxidant properties of pear juice prepared through pectinase enzyme-assisted extraction from William Bartlett variety. *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 15, n .1, p. 743-757, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00676-x>

GARZON, D., C., HABRYLO, O., LEMAIRE, A., GUILLAUME, A., CARRÉ, Y., MILLET, C.; PELLOUX, J. Characterization of a novel strain of *Aspergillus aculeatinus*: From rhamnogalacturonan type I pectin degradation to improvement of fruit juice filtration. *Carbohydrate Polymers*, v. 262, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117943>

GIACOBBE, S., PEPE, O., VENTORINO, V., BIROLO, L., VINCIGUERRA, R., FARACO, V. Identification and Characterization of a Pectinolytic Enzyme from *Paenibacillus xylanolyticus*. *Bioresources*, v. 9, I 3, p. 4873-4887, 2014.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. D. Thermostable enzymes: sources, production and industrial applications. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.

GUIMARÃES, N. C. A.; SORGATTO, M.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; BETINI, J. H. A.; ZANOELO, F. F.; MARQUES, M. R.; POLIZELI, M. L. T. M.; GIANNESI, G. C. Xylanase production from *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*: production using agroindustrial residues and biobleaching effect on pulp. *J. Biocatal. Biotransfor.*, v. 2, n. 1, 2013.

HAILE, S.; AYELE, A. Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications. *Scientific World Journal*, v. 11, p. 1881305, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/1881305>

HAILE, M.; KANG, W.H. Isolation, Identification, and Characterization of Pectinolytic Yeasts for Starter Culture in Coffee Fermentation. *Microorganisms*, v. 28, 2019. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100401>

HAKIMZADEH, V.; SADEGHI, A. Techniques for Immobilization and Detection of Lipase: A Review. *Chemistry Research Journal*, v. 2, n. 6, p. 214-224, 2017.

HAMDY, H.S. Purification and characterization of the pectin lyase produced by and protein inhibitors on enzyme activity revealed  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  *Rhizopus oryzae* grown on orange peels. *Ann. Microbiol.*, v. 55, p. 205-211, 2005.

HOSSEINI, S. S.; KHODAIYAN, F.; MOUSAVI, S. M.; AZIMI, S. Z. Clarification of the pomegranate juice in a bioreactor packed by pectinase enzymes immobilized on the glass bead activated with polyaldehyde polysaccharides. *LWT*, v. 137, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110500>

INFANTE, J. C. Imobilização e caracterização bioquímica de mananases e pectinases produzidas por *Aspergillus brasiliensis*: potencial para aplicação na clarificação de sucos de frutas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 129 p. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, 2019.

JOHN, J., KAIMAL, K.K.S., SMITH, M.L., RAHMAN, P.K.S.M., CHELLAM, P.V. Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.224>

KAPOOR, M.; BEG, Q. K.; BHUSHAN, B.; SINGH, K.; DADHICH, K.S.; HOONDAL, G.S. Application of an alkaline and thermostable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2 in

degumming of ramie (*Boehmeria nivea*) and sunn hemp (*Crotalaria juncea*) bast fibres. *Process Biochemistry*, v. 36, p. 803-807, 2001.

KAUR, A.; RISHI, V.; SONI, S. K.; RISHI, P. A novel multi-enzyme preparation produced from *Aspergillus niger* using biodegradable waste: a possible option to combat heterogeneous biofilms. *AMB Express*, v. 10, p. 36, 2020.

KAVUTHODI, B.; SEBASTIAN, D. Review on bacterial production of alkaline pectinase with special emphasis on *Bacillus* species, *Biosci. Biotechnol. Res. Commun.* v. 11, n. 1, p. 18-30, 2018. <https://doi.org/10.21786/bbrc/11.1/4>

KLICH, M. A.; PITT, J. I. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their telemorphs. Published by Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing, 1988.

KOHLI, P.; GUPTA, R. Alkaline pectinases: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4, issue 3, p. 279-285, 2015.

KUMAR, Y.S., KUMAR, P.V., REDDY, O.V.S., Pectinase production from mango peel using *Aspergillus foetidus* and its application in processing of mango juice. *Food Biotechnol.* 26, 107-123, 2012.

KUVVET, C.; UZUNER, S.; CEKMECELIOGLU, D. Improvement of Pectinase Production by Co-culture of *Bacillus* spp. Using Apple Pomace as a Carbon Source. *Waste and Biomass Valorization*, v. 10, n 5, p. 1241-1249, 2019.

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

LI, P., XIA, J., SHAN, Y., NIE, Z., WANG, F. Effects of Surfactants and Microwave-assisted Pretreatment of Orange Peel on Extracellular Enzymes Production by *Aspergillus japonicus* PJ01. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 176, p. 758-771, 2015a.

LI, P. J.; XIA, J. L.; SHAN, Y.; NIE, Z. Y. Comparative study of multi-enzyme production from typical agro-industrial residues and ultrasound-assisted extraction of crude enzyme in fermentation with *Aspergillus japonicus* PJ01. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 38, p. 2013-2022, 2015b.

LOWRY, H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 267-275, 1951.

MA, Y.; SUN, S.; HAO, H.; XU, C. Production, purification and characterization of an exopolysaccharidase from *Penicillium janthinellum* sw09. *An Acad Bras Cienc*, v. 88, p. 479-487, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201620150051>

MAHESH, M.; ARIVIZHIVENDHAN, K. V.; MAHARAJA, P.; BOOPATHY, R.; HAMSAVATHANI, V.; SEKARANA, 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.

MAHMOODI, M.; NAJAFPOUR, G. D.; MOHAMMADI, M. Bioconversion of agroindustrial wastes to pectinases enzyme via solid state fermentation in trays and rotating drum bioreactors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 21, p. 101280, 2019.

MALLER, A.; DAMÁSIO, A. R. L.; SILVA, T. M.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Biotechnological potential of agro-industrial wastes as a carbon source to thermostable polygalacturonase production in *Aspergillus niveus*. *Enz. Res.*, v. 2011, ID 289206, 2011.

MALLER, A.; SILVA, T. M.; DAMÁSIO, A. R. L.; REIS, V. R. A.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M. Production of pectin lyase by *Aspergillus niveus* under submerged and solid state fermentations using agro-industrial residues as carbon sources. *Int. Res. J. Microbiol.*, v. 3, n.1, p. 29-35, 2012.

MARTIN, N., Guez, M. A.U., Sette, L. D., Da Silva, R., Gomes, E. Pectinase production by a Brazilian thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 in solid-state and submerged fermentation. *Microbiology*, 2010, v. 79, n. 3, p. 306-313, 2010. <https://doi.org/10.1134/S0026261710030057>

MARTINS, E. S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases by thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochem*, v. 37, p. 949-954, 2002.

MARTINS, E. D. S. Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido. 108 p. Tese (doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Julio de Mesquita, Rio Claro, 2006.

MARTINS, E.S.; SILVA, D.; LEITE, R.S.R.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 91, p. 291-299, 2007.

MARTINS, E. D. S.; 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, p. 1199-1205, 2012.

MARZO, C.; DÍAZ, A. B.; CARO, I.; BLANDINO, A. Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. *Waste Management & Research*, v. 1, p. 8, 2018.

MCCLENDON, S.D., BATH, T., PETZOLD, C.J. et al. *Thermoascus aurantiacus* is a promising source of enzymes for biomass deconstruction under thermophilic conditions. *Biotechnol Biofuels*, v. 5, p. 54, 2012. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-5-54>

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

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

MINH, N. P. Influence of enzymatic concentration and incubation time in processing of pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) fruit juice. *Research on Crops*, v. 21, n. 3, p. 494-497, 2020. <https://doi.org/10.31830/2348-7542.2020.078>

MULLER, S.; CONCHA, D.; VASQUEZ, P.; RODRIGUEZ-NUNEZ, K.; MARTINEZ, R.; BERNAL, C. Effect of the immobilization of pectinase on the molecular weight distribution of pectin oligosaccharides obtained from citrus pectin. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 43, p. 102389, 2022.

MURUGAN, T., DEEPIKA, P., KOWSALYA, A., SIVASUBRAMANIAN, K., REJISHA, R. P., MURUGAN, M., & ALBINO WINS, J. Production and characterization of extracellular pectinase from a newly isolated *Bacillus* species from fruit waste soil. *Materials Today: Proceedings*, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.607>

NADUMANE, V. K., VENKATACHALAM, P., GAJARAJ, B. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering, Elsevier. Chapter 19 - *Aspergillus* Applications in Cancer Research, Editor(s): Vijai Kumar Gupta, p. 243-255, ISBN 9780444635051, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00020-8>

NAGAI, M.; KATSURAGI, T.; TERASHITA, T.; YOSHIKAWA, K.; SAKAI, T. Purification and characterization of an endo- polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. V. 64, p. 1729-1732 , 2000.

NAWAZ, M.A., REHMAN, H. U., BIBI, Z., AMAN, A., UL QADER, S.A. Continuous degradation of maltose by enzyme entrapment technology using calcium alginate beads as a matrix. *Biochem. Biophys. Rep.*, v. 4, p. 250-256, 2015.

NIGHOJKAR, A., PATIDAR, M. K., & NIGHOJKAR, S. Pectinases: Production and Applications for Fruit Juice Beverages. *Processing and Sustainability of Beverages*, p. 235-273, 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815259-1.00008-2>

NIGHOJKAR, S.; PHANSE, Y.; SINHA, D.; NIGHOJKAR, A.; KUMAR, A. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1136-1140, 2006.

NITURE, S. K.; PANT, A. Purification and biochemical characterization of polygalacturonase II produced in semi-solid medium by a strain of *Fusarium moniliforme*. *Microbial Research, Jena*, v. 159, n. 3, p. 305-314, 2004.

OLUOCH, K. R.; OKANYA, P. W.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. Protease-, Pectinase- and Amylase-Producing Bacteria from a Kenyan Soda Lake. *Open Biotechnology Journal*, v. 12, p. 33-45, 2018.

ONGARATTO, R. S., VIOTTO, L. A. Effect of the enzymatic treatment on the viscosity and fiber and pectin contents of pitanga (*Eugenia uniflora* L.) juice. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 18, n. 3, p. 231-238, Campinas, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.5514>

ORTEGA, N.; DE DIEGO, S.; PEREZ-MATEOS, M.; BUSTO, M.D. Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification. *Food Chemistry*, v. 88, p. 209-217, 2004.

ORTIZ, G. E.; PONCE-MORA, M. C.; NOSEDA, D. G.; CAZABAT, G.; SARAVALLI, C.; LÓPEZ, M. C.; GIL, G. P.; BLASCO, M.; ALBERTÓ, E. O. Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1873-0>

OUMER, O. J., ABATE, D. Screening and molecular identification of pectinase producing microbes from coffee pulp. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2961767>

OZYILMAZ, G.; GUNAY, E. Clarification of apple, grape and pear juices by co-immobilized amylase, pectinase and cellulase. *Food Chemistry*, v. 9, n. 398, p. 133900, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133900>

PASIN, T. M. Prospecção, purificação e propriedades funcionais de uma glucoamilase de *Aspergillus japonicus*: aplicação do extrato enzimático em reciclagem de papel. 156 p. Departamento de Bioquímica e Imunologia. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Brasil, 2015.

PATHAK, A. P.; JADHAV, S.R. Production and characterization of a thermo-ph stable pectinase from *Bacillus licheniformis* un-1: A novel strain isolated from unapdev hot spring. *Indian journal of Geo-Marine Sciences*, v. 48, p. 670-677, 2019.

PATIDAR, M.K., NIGHOJKAR, S., KUMAR, A. et al. Production of polygalacturonase using Carica papaya peel biowaste and its application for pomegranate juice clarification. *Environmental Sustainability*, v. 3, p. 509-520, 2020. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00138-6>

PATIDAR, M.K., NIGHOJKAR, S., KUMAR, A., NIGHOJKAR, A. Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. *3 Biotech*, v. 8, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1220-4>

PATIDAR, M.K., NIGHOJKAR, A., NIGHOJKAR, S., KUMAR, A. Purification and characterization of polygalacturonase produced by *Aspergillus niger* AN07 in solid state fermentation. *Can. J. Biotechnol.*, v. 1, p. 11-18, 2017. <https://doi.org/10.24870/cjb.2017-000102>

PHUTELA U, DHUNA V, SANDHU S, CHADHA BS. Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. *Braz J Microbiol*, v. 36, p. 63-69, 2005.

PICCOLI-VALLE, R. H.; PASSOS, F. M. L.; PASSOS, F. J. V.; SILVA, D. O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. *Braz. J. Microbiol*, v. 32, n. 2, p. 135-140, 2001.

PINHEIRO, V. E.; DESAGIACOMO, C. C. V.; MICHELIN, M.; MALLER, A.; MONTEIRO, L. M. O.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. *Neosartorya glabra* polygalacturonase produced from fruit peels as inducers has the potential for application in passion fruit and apple juices. *Braz. J. Food Technol.*, v. 20, 2017. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.16316>

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais. *Revista de Química Industrial*, v. 74, p. 17-20, 2006.

POLETTI, P. Produção, recuperação e avaliação de pectinases de *Aspergillus niger* LB-02-SF obtidas em biorreator de tambor rotativo. 139 p. Tese (doutorado), Instituto de biotecnologia. Programa de pós-graduação em biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 2015.

POLIZELI, M. L. T. M.; DAMASIO, A.; MALLER, A.; CABRAL, H.; POLIZELI, A. Pectinases produced by microorganisms. In: POLIZELI, M. L. T. M.; Rai, M. (Org.). *Fungal Enzymes*, 1ed. Boca Raton. USA: CRC Press, v. 1, p. 316-340, 2013.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHCHORN, S. E. *Biologia vegetal*. 6a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REHMAN, H.U., AMAN, A., SILIPO, A., QADER, S.A.U., MOLINARO, A., ANSARI, A. Degradation of complex carbohydrate: immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. *Food Chem.*, v. 139, p. 1081-1086, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.069>

RESENDE, J. M.; CHITARRA, M. I. F.; MALUF, W. R.; CHITARRA, A. B.; SAGGIN JÚNIOR, O.J. Atividade de enzimas pectina metil esterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multilocular. *Horticultura Brasileira*, v. 22, n. 2, p. 206-212, 2004.

RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J.A.; TERENCEZI, H.F.; RECHIA, C.G.V.; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 259, p.156-160, 2001.

ROCHA, J. C., DA SILVA ARAÚJO, J., DE PAIVA, W. K. V., RIBEIRO, E. S. S., DE ARAÚJO PADILHA, C. E., DE ASSIS, C. F., ... DE SOUSA JUNIOR, F. C. Yellow mombin pulp residue valorization for pectinases production by *Aspergillus niger* IOC 4003 and its application in juice clarification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 30, p. 101876, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101876>

ROSMINE, E., SAINJAN, N. C., SILVESTER, R., ALIKKUNJU, A., VARGHESE, S. A. Statistical optimisation of xylanase production by estuarine *Streptomyces* sp. and its application in clarification of fruit juice. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 15, n 2, 393-401, 2017.

SANCHEZ, S. R., SANCHEZ, I. G., AREVALO-VILLENA, M., BRIONES PEREZ, A. Production and immobilization of enzymes by solid-state fermentation of agroindustrial waste. *Bioprocess Biosyst Eng*, v. 38, p. 587-593, 2015.

- SANDRI, I. G.; SILVEIRA, M. M. Production and Application of Pectinases from *Aspergillus niger* Obtained in Solid State Cultivation. *Beverages*, 2018. <https://doi.org/10.3390/beverages4030048>
- SANDRI, I. G.; LORENZONI, C. M. T.; FONTANA, R. C.; SILVEIRA, M. M. D. Use of pectinases produced by a new strain of *Aspergillus niger* for the enzymatic treatment of apple and blueberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, v. 51, p. 469-475, 2013.
- SANDRI, I. G.; FONTANA, R. C.; BARFKNECHT, D. M.; SILVEIRA, M. M. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT - Food Science and Technology*, v. 44, p. 2217-2222, 2011.
- SANTI, L., BERGER, M., SILVA, W. O. B. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. *Caderno pedagógico, Lajeado*, v. 11, n. 1, p. 130-139, 2014.
- SASSI, A. H.; TOUNSI, H.; TRIGUI-LAHIANI, H.; BOUZOUITA, R.; ROMDHANE, Z. B.; GARGOURI, A. A low-temperature polygalacturonase from *P. occitanis*: Characterization and application in juice clarification. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 91, p. 158-164, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.075>
- SEMENOVA, M. V.; GRISHUTIN, S. G.; GUSAKOV, A. V.; OKUNEV, O. N.; SINITSYN, A. P. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry*, v. 68, p. 559-569, 2003.
- SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. Enhanced production of pectinase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using banana peels as substrate. *3 Biotech.*, v. 6, n. 1, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0353-y>
- SHRESTHA, S., RAHMAN, M.S., QIN, W. New insights in pectinase production development and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 105, n. 24, p. 9069-9087, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11705-0>
- SILVA, J. D. C.; DE FRANÇA, P. R. L.; DE MELO, A. H. F.; NEVES-PETERSEN, M. T.; CONVERTI, A.; SOUZA PORTO, T. Optimized production of *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonases for pectin hydrolysis in hogplum (*Spondias mombin* L.) juice. *Process Biochemistry*, v. 79, p. 18-27, 2019a.
- SILVA, P. O., GUIMARÃES, N. C. A., SERPA, J. D. M., MASUI, D. C., MARCHETTI, C. R., VERBISCK, N. V., ZANOELO, F. F., RULLER, R., GIANNESI, G. C. Application of an endo-xylanase from *Aspergillus japonicus* in the fruit juice clarification and fruit peel waste hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101312, 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101312>
- SOLÍS, S.; LOEZA, J.; SEGURA, G.; TELLO, J., REYES, N., LAPPE, P., GUITÉRREZ, L., RIOS, F., HUIRÓN, C. Hydrolysis of orange peel by a pectin lyase-overproducing hybrid obtained by protoplast fusion between mutant pectinolytic *Aspergillus flavipes* and *Aspergillus niveus* CH-Y-1043. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 44, p. 123-128, 2009.
- SOLIS-PEREIRA, S.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M. Effects of different carbon sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus*

*niger* in submerged and solid state fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 1, p. 36-41, 1993.

STOCK, D. Conversão de pectina cítrica a ácido D-Galacturônico usando pectinases produzidas por fermentação no estado sólido. 113 p. Dissertação (mestrado), Pós-graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, 2013.

SUDEEP, K. C.; UPADHYAYA, J.; JOSHI, D. R.; LEKHAK, B.; CHAUDHARY, D. K.; PANT, B. R.; 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. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020059>

SUHAIMI, D. J. D.; MALEK, R. A.; HANAPI, S. Z.; AMBEHABATI, K. K.; KEAT, H. C.; PRAKASHAM, S.; ELSAYED, E. A.; MISSON, M.; EL ENSHASY, H. Fungal Pectinases: Production and Applications in Food Industries. *Fungi in Sustainable Food Production, Fungal Biology*, Chapter 6, 2021. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-64406-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-64406-2_6)

TAPRE, A. R.; JAIN, R. K. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal*, v. 21, n. 2, p. 447-453, 2014.

TASGIN, E.; BABAGIL, A.; NADAROGLU, H.; ALLEGRETTI, P. E. Immobilization of Purified Pectin Lyase from *Acinetobacter calcoaceticus* onto Magnetic Carboxymethyl Cellulose Nanoparticles and Its Usability in Food Industry. *Journal of Chemistry*, v. 2020, p. 1–12, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4791408>

TESSMANN, M. S.; TESSMANN, C.; LIMA, L. S.; QUINTÃO, M. B.; BANDEIRA, M. L. S. F. Bioproducts from agro-industrial plant residues: opportunities for sustainable reuse. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 9, p. 89356-89381, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n9-208>

TORIMIRO, N.; ADEDIWURA, V. A.; OJO, S. T.; OLUWADARE, A. O.; OKONJI, R. E. Pectinolytic activities of pectinase produced by some bacterial isolates cultured from deteriorating fruits. *Nigerian Journal of Biotechnology*, v. 35, p. 91, 2018. <https://doi.org/10.4314/njb.v35i2.12>

TOUNSI, H.; AZZA, H. S.; 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, *J. Mol. Catal. B Enzym*, v. 127, p. 56-66, 2016.

TRINDADE, L. V.; DESAGIACOMO, C.; POLIZELI, M. L. T. M.; DAMASIO, A. R. 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. Res. Int.*, v. 2016, p. 1-10, 2016.

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

VAZ, R. P.; VICI, A. C.; POLIZELI, M. L. T. M.; MAGALHÃES, P. O.; FILHO, E. X. F. Immobilization studies of a pectinase produced by *Aspergillus terreus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2020. <https://doi.org/10.1002/bab.2004>

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. “Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability”. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, n. 1, p. 1-43, 2001.

YADAV, S.; YADAV, P. K.; YADAV, D.; YADAV, K. D. S. Pectin lyase: a review. *Process Biochemistry*, v. 44, p. 1-10, 2009.

YUAN, P., MENG, K., H. HUANG, P. SHI, H. LUO, P. YANG, B. YAO, A novel acidic and low-temperature-active endo-polygalacturonase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669 with potential for application in apple juice clarification. *Food Chemistry*, v. 129, n. 4, p. 1369-1375, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.065>

ZEHRA, M.; SYED, M. N.; SOHAIL, M. Banana Peels: A Promising Substrate for the Coproduction of Pectinase and Xylanase from *Aspergillus fumigatus* MS16. *Polish Journal of Microbiology*, v. 69, n. 1, p. 19-26, 2020.

ZENI, J. Produção e caracterização parcial de pectinases obtidas por uma nova cepa de *Penicillium brasilianum* em fermentação submersa. 134 p. Tese (doutorado), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI – Campus de Erechim, 2011.

ZHANG, G.; LI, S.; XU, Y. et al. Production of alkaline pectinase: a case study investigating the use of tobacco stalk with the newly isolated strain *Bacillus tequilensis* CAS-MEI-2-33. *BMC Biotechnol* v. 19, n. 45, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0526-6>

**APÊNDICE A** – Production and biochemical characterization of *Aspergillus japonicus* pectinase produced using passion fruit peel as a low-cost alternative carbon source for application in the clarification of fruit juices

**Waste and Biomass Valorization**

**Production and biochemical characterization of *Aspergillus japonicus* pectinase produced using passion fruit peel as a low-cost alternative carbon source for application in the clarification of fruit juices**

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	Production and biochemical characterization of <i>Aspergillus japonicus</i> pectinase produced using passion fruit peel as a low-cost alternative carbon source for application in the clarification of fruit juices
<b>Article Type:</b>	Original research article
<b>Keywords:</b>	pectinases; <i>Aspergillus japonicus</i> ; low-cost alternative carbon sources; passion fruit peel; fruit juice clarification
<b>Corresponding Author:</b>	Giovana Cristina Giannesi, Ph.D Universidade Federal de Mato Grosso do Sul BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Nelciele Cavalieri de Alencar Guimarães
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Nelciele Cavalieri de Alencar Guimarães Nathalia Nunes Glienke Alex Graça Contato Rodrigo Mattos Silva Galeano Clarice Rossato Marchetti Marcos Paulo Goncalves Rosa Jéssica Schlosser de Sa Teles Ana Lorena de Oliveira Simas Fabiana Fonseca Zanoelo Douglas Chodi Masui Giovana Cristina Giannesi, Ph.D
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Funding Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	Pectinases are a complex group of enzymes that degrade pectic substances. We produced pectinases efficiently using wastes/agro-industrial products through submerged fermentation (SmF) and solid-state fermentation (SSF), making the production cheaper. Passion fruit peel was the best inducer of pectinase production by <i>Aspergillus japonicus</i> during SSF. The biochemical characterization of the pectinase produced showed that the best pH and temperature for pectinase activity were pH 4.0 and 60 °C. Pectinase was completely stable for 4 h, maintaining 88%, 84%, and 72% activity at pH 3.0, 4.0, and 5.0, respectively, after 24 h. <i>A. japonicus</i> pectinase was used in clarification of different fruit juices and was superior to the commercial pectinase (Pectinex) in all the fruits tested. Pectinase application achieved the best clarification in mango (Haden) pulps (85.56%), whereas Pectinex only clarified 50.89%. Moreover, in apple (Argentina), <i>A. japonicus</i> pectinase showed 66.32% clarification,

	<p>whereas Pectinex only showed 12.67% clarification. Furthermore, in apple (Europe), banana "da terra", mango (Palmer), and white guava, <i>A. japonicus</i> pectinase showed 52.59%, 49.04%, 46.7%, and 46.4% clarification, respectively, whereas Pectinex showed lower or significantly similar results with 13.34%, 38.29%, 49.3%, and 33.6% clarification, for the same pulps, respectively. <i>A. japonicus</i> pectinases have properties that enable them to efficiently clarify various types of juices. Additionally, their production is inexpensive.</p>
<b>Suggested Reviewers:</b>	<p>Sikander Ali The University of Lahore dr.sikanderali@gcu.edu.pk The reviewer works with enzymes and their applications.</p> <p>Niranjana Koirala University of Macau koirala.biochem@gmail.com The reviewer works with enzymes and their applications.</p> <p>Padmanaban Velayudhaperumal Chellam Center for Research vcpadmanaban88@gmail.com The reviewer works with enzymes and their applications.</p> <p>Amit K Jaiswal Technological University Dublin amit.jaiswal@TUDublin.ie The reviewer works with enzymes and their applications.</p> <p>T Murugan Sri Sankara Arts and Science College tmurugamb@gmail.com The reviewer works with enzymes and their applications.</p>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 **Production and biochemical characterization of *Aspergillus japonicus* pectinase produced using passion fruit**  
2 **peel as a low-cost alternative carbon source for application in the clarification of fruit juices**

3

4 Nelciele Cavaliere de Alencar Guimarães<sup>1</sup>, Nathalia Nunes Glienke<sup>1</sup>, Alex Graça Contato<sup>1</sup>, Rodrigo Mattos Silva  
5 Galeano<sup>1</sup>, Clarice Rossato Marchetti<sup>1</sup>, Marcos Paulo Gonçalves Rosa<sup>3</sup>, Jéssica Schlosser de Sa Teles<sup>1</sup>, Ana Lorena de  
6 Oliveira Simas<sup>1</sup>, Fabiana Fonseca Zanoelo<sup>1</sup>, Douglas Chodi Masui<sup>1</sup>, Giovana Cristina Giannesi<sup>1</sup>

7

8 <sup>1</sup>*Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos-LBq, Instituto de Biociências-INBIO, Universidade Federal*  
9 *de Mato Grosso do Sul-UFMS, Campo Grande, MS, Brazil*

10 <sup>2</sup>*Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de*  
11 *São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil*

12 <sup>3</sup>*Laboratório de Anatomia Vegetal-LAVe, Instituto de Biociências-INBIO, Universidade Federal de Mato Grosso do*  
13 *Sul-UFMS, Campo Grande, MS, Brazil*

14

15 *\*Corresponding author: Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos-LBq, Instituto de Biociências-INBIO,*  
16 *Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS, CEP: 79070-900. Campo Grande, MS, Brazil.*

17 *E-mail address: giannesigiovana@hotmail.com (G.C. Giannesi).*

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

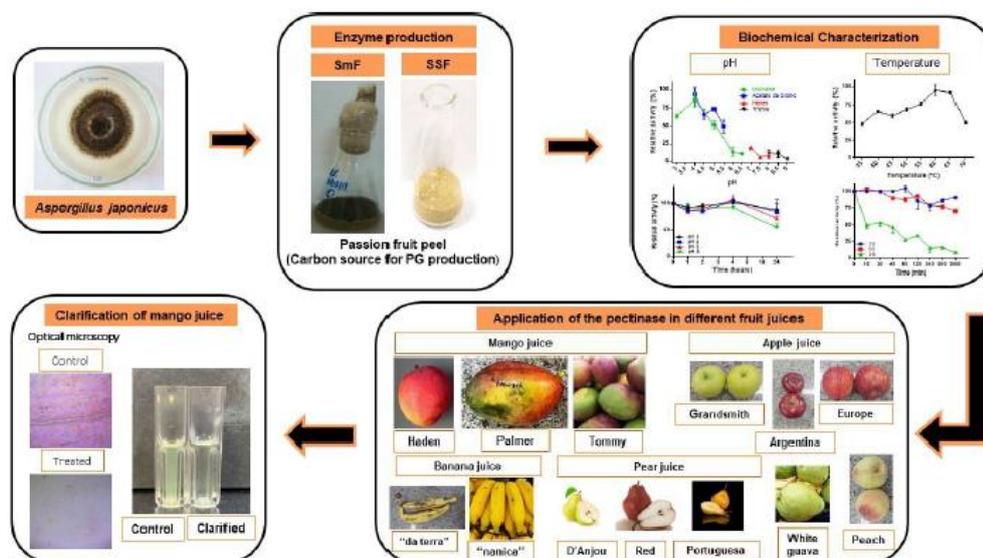
**Highlights**

- Passion fruit peel was the best inducer of pectinase production by *A. japonicus*;
- *japonicus* pectinase was superior to the commercial pectinase in all fruits;
- *japonicus* pectinase clarification in apple was five times superior to Pectinex.

**Statement of Novelty**

The novelty observed in this study is the production of the enzyme using residue such as passion fruit peel as a carbon source, and the clarification in juices presented by the enzyme, with results superior to those presented by a commercial enzyme.

**Graphic Abstract**



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

#### 46 ABSTRACT

47 Pectinases are a complex group of enzymes that degrade pectic substances. We produced pectinases efficiently using  
48 wastes/agro-industrial products through submerged fermentation (SmF) and solid-state fermentation (SSF), making  
49 the production cheaper. Passion fruit peel was the best inducer of pectinase production by *Aspergillus japonicus* during  
50 SSF. The biochemical characterization of the pectinase produced showed that the best pH and temperature for  
51 pectinase activity were pH 4.0 and 60 °C. Pectinase was completely stable for 4 h, maintaining 88%, 84%, and 72%  
52 activity at pH 3.0, 4.0, and 5.0, respectively, after 24 h. *A. japonicus* pectinase was used in clarification of different  
53 fruit juices and was superior to the commercial pectinase (Pectinex) in all the fruits tested. Pectinase application  
54 achieved the best clarification in mango (Haden) pulps (85.56%), whereas Pectinex only clarified 50.89%. Moreover,  
55 in apple (Argentina), *A. japonicus* pectinase showed 66.32% clarification, whereas Pectinex only showed 12.67%  
56 clarification. Furthermore, in apple (Europe), banana “da terra”, mango (Palmer), and white guava, *A. japonicus*  
57 pectinase showed 52.59%, 49.04%, 46.7%, and 46.4% clarification, respectively, whereas Pectinex showed lower or  
58 significantly similar results with 13.34%, 38.29%, 49.3%, and 33.6% clarification, for the same pulps, respectively.  
59 *A. japonicus* pectinases have properties that enable them to efficiently clarify various types of juices. Additionally,  
60 their production is inexpensive.

61  
62 **Keywords:** pectinases; *Aspergillus japonicus*; low-cost alternative carbon sources; passion fruit peel; fruit juice  
63 clarification.

64  
65 **ABBREVIATIONS:** SmF: submerged fermentation; SSF: solid-state fermentation.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 74 1. INTRODUCTION

75 Owing to rapid population growth and changing consumer preferences, agricultural food production has  
76 tripled in the last 50 years. Agriculture is responsible for 21% of greenhouse gas emissions, and millions of tons of  
77 agricultural waste are produced annually. These agricultural residues, such as fruit peels, can be used by  
78 microorganisms as substrates during fermentation to produce enzymes that are used in many industries [1, 2, 3].  
79 Therefore, it is necessary to develop new innovative and sustainable alternatives to add value to agricultural waste.

80 Pectin is a major component of citrus peels (4–30%) and is found in the plant cell wall along with cellulose  
81 and hemicellulose polymers, which together give structure, firmness, and compressive strength to plant tissues.  
82 Typically, pectin is extracted for use as a stabilizer in the food industry, although most pectin is discarded or  
83 incinerated [4]. The main chain of pectin is formed by hundreds of D-galacturonic acid (GalA) residues joined via an  
84  $\alpha$ -1,4 bond, and has side chains formed mainly by sugars such as rhamnose, galactose, arabinose, and xylose [5].

85 As a complex polysaccharide, pectin is a mixture of substances called pectic substances. Based on the type  
86 of main-chain modification, pectic substances are classified as protopectin, pectic acid, pectinic acid, and pectin [5].

87 Pectinases are a complex group of enzymes that degrade pectic substances and are classified into three main  
88 categories based on their mechanisms of action: protopectinases, de-esterifiers (esterases), and depolymerizers  
89 (hydrolases and lyases). Although pectinases are produced from different sources, the most prominent sources are of  
90 microbial origin owing to their high diversity and availability, rapid growth, short fermentation time, and the  
91 possibility of genetic manipulation. Furthermore, microbial pectinases show broad substrate specificity, inducibility,  
92 versatility, and the ability to act on a variety of pectic substances, making them potential biocatalysts in many industrial  
93 processes [6].

94 Traditional methods for enzyme production include submerged fermentation (SmF) and solid-state  
95 fermentation (SSF). In addition to standardization of the best culture medium for production, the biochemical  
96 characteristics of pectinases, such as operating temperature and pH range, are important for determining their possible  
97 applications. This is because industrial processing conditions, such as the use of high temperatures and different pH  
98 values, can render the enzymes unstable and completely inactive during processing [7]. Therefore, it is necessary to  
99 optimize and/or maximize microbial pectinase production and activity.

100 Mechanical grinding of fruits during the extraction of juice yields products with a gelatinous and viscous  
101 appearance, as positively charged proteins are coated by negatively charged pectin. The addition of pectinases to fruit

1  
2  
3  
4 102 juice results in the degradation of pectin and the exposure of positively charged proteins, which in turn reduces  
5  
6 103 electrostatic repulsion between particles [8]. Furthermore, pectinase supplementation breaks the glycosidic bonds  
7  
8 104 present between GalA monomers, thereby increasing the juice yield and decreasing the water-holding capacity of  
9  
10 105 pectin [9]. Therefore, this study provides an innovative, objective approach to the production and biochemical  
11  
12 106 characterization of pectinases produced by *Aspergillus japonicus* using low-cost carbon sources whose applicability  
13  
14 107 in the clarification of fruit juices is comparable with that of commercial pectinase (Pectinex).  
15  
16 108

## 18 109 2. MATERIALS AND METHODS

### 22 111 2.1 Microorganisms and maintenance

24 112 *Aspergillus japonicus* UFMS 48.136 (GenBank accession code MW587714) was collected and isolated from  
25  
26 113 the soil of the Private Natural Heritage Reserve of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo  
27  
28 114 Grande, MS, Brazil, and identified by Silva et al. [10]. For the maintenance of the strain, repetitions were made on  
29  
30 115 potato dextrose agar at 35 °C for a period of 4–10 days, and was subsequently kept at 4 °C in a refrigerator for a  
31  
32 116 maximum of 30 days.  
33  
34 117

### 36 118 2.2 Production of pectinase via SmF and SSF using different carbon sources

38 119 For the production of extracellular pectinase via submerged fermentation (SmF), the fungus was grown initially  
39  
40 120 in modified liquid medium [11] containing (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.1%), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.4%), peptone (0.2%), yeast extract  
41  
42 121 (0.025%), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.05%), KCl (0.05%), NaNO<sub>3</sub> (0.5%), CaCl<sub>2</sub> (0.0003%), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.00035%),  
43  
44 122 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.0004%), and Tween 80 (0.1%) in 100 mL of distilled water at pH 6.0. The inoculum was prepared  
45  
46 123 using 1×10<sup>6</sup> spores/mL of fungi suspended in distilled water. Furthermore, 250 μL of this suspension was added to 25  
47  
48 124 mL Erlenmeyer flasks containing 5 mL of culture medium for stationary growth, and 500 μL of the suspension was  
49  
50 125 added to 50 mL Erlenmeyer flasks containing 10 mL of culture medium for growth under agitation (110 rpm) for 96  
51  
52 126 h at 35 °C. After growth during SmF, the cultures were filtered under vacuum with filter paper (Whatman no. 1) to  
53  
54 127 obtain a crude extract containing extracellular pectinase.  
55  
56 128

57 128 Solid-state fermentation (SSF) was performed according to Martins et al. [12]. The fungus was grown in 250  
58  
59 129 mL Erlenmeyer flasks containing 5 g of the carbon sources and 10 mL of salt solution, composed of a mixture of  
60  
61

1  
2  
3  
4 130 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.1%) and MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0.1%), for 120 h at 35 °C. After growth, the cultures were resuspended in 50  
5  
6 131 mL of distilled water, shaken for 30 min, filtered through sieves, and centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4 °C. The  
7  
8 132 collected supernatant was considered the crude extract containing the enzymes.

10 133 Various agro-industrial residues and products were used as low-cost carbon sources (1%) for pectinase  
11  
12 134 production: powdered orange peel, powdered orange pomace, powdered passion fruit peel, extruded orange peel, fine  
13  
14 135 mate yerba mate, fine medium tereré yerba mate, coarse tereré yerba mate, used fine mate yerba mate, used fine  
15  
16 136 medium tereré yerba mate, used coarse tereré yerba mate, cassava flour from Furnas do Dionísio/MS, cassava flour  
17  
18 137 from Rondonópolis/MT, coarse cassava flour from Pará, coarse cassava flour from Cuiaba/MT, corn flour, coarse  
19  
20 138 cassava flour Cruzeiro do Sul/Acre, wheat bran, glucose, exploded sugarcane bagasse, corn husk, and soy flour. All  
21  
22 139 of these were purchased in markets.

23  
24 140

### 26 141 **2.3 Enzyme and protein assays**

27  
28 142 The initial pectinase activity was determined by incubating the enzyme with 1% citrus pectin (Sigma-Aldrich,  
29  
30 143 Saint Louis, MI, USA) in 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) at 45 °C. At appropriate intervals, the reaction was  
31  
32 144 interrupted by adding 3,5-dinitrosalicylic acid reagent according to the methodology of Miller [13] using GalA as a  
33  
34 145 standard.

36 146 Protein measurement was performed according to the method described by Lowry et al. [14] using bovine  
37  
38 147 serum albumin as a standard. Specific activity was defined as units per milligram of protein (U/mg).

40 148

### 42 149 **2.4 Enzymatic characterization**

44  
45 150

#### 46 151 **2.4.1 Optimum pH**

48 152 The optimal pH for pectinase activity was determined by incubating the enzyme with 100 mM sodium acetate  
49  
50 153 buffer (pH 4.0–5.5), 100 mM Hepes buffer (pH 7.0–8.0), 100 mM Trizma HCl buffer (pH 8.0–9.0), and McIlvaine  
51  
52 154 buffer (pH 3.0–6.5), containing 1% citrus pectin as substrate.

54  
55 155

56  
57 156

58  
59 157

60

61

62

63

64

65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

#### 158 2.4.2 Optimum temperature

159 The optimal temperature was determined by incubating the pectinase with sodium acetate buffer (100 mM;  
160 pH 4.0) at a temperature range of 35–70 °C. Relative activity was calculated as a percentage of maximum activity.

#### 162 2.4.3 pH stability

163 To evaluate the effect of pH on stability, 100 µL of pectinase was incubated with 50 µL of McIlvaine buffer  
164 at a pH range of 3.0–6.0 for 24 h at 0 °C. Aliquots were collected at various time points. The activity was expressed  
165 as residual activity, with a value of 100% corresponding to the activity performed at pH and optimal temperature of  
166 the enzyme.

#### 168 2.4.4 Thermostability

169 The thermostability was evaluated at temperatures of 25 (on the bench), 50, and 55 °C, at different incubation  
170 times: 10, 20, and 40 min as well as 1, 2, 4, and 6 h. The activity was expressed as residual activity, with a value of  
171 100% corresponding to the activity performed at pH and optimal temperature of the enzyme.

#### 173 2.5 Application of pectinase in juice clarification

174 Pulps of 13 different fruits purchased from the local market were used for the clarification tests: apple  
175 (Argentina), apple (Europe), apple (Grandsmith) (*Malus domestica* Borkh), banana “da terra” (*Musa sapientum* L.),  
176 banana “nanica” (*Musa acuminata*, ‘Dwarf Cavendish’), mango (Haden) (*Mangifera indica* L. ‘Haden’), mango  
177 (Palmer) (*Mangifera indica* L., ‘Palmer’), mango (Tommy) (*Mangifera indica* ‘Tommy Atkins’), peach (*Prunus*  
178 *persica*), pear (D’Anjou) (*Pyrus communis* ‘D’Anjou’), pear (Portuguesa) (*Pyrus* L.), pear (red) (*Pyrus* L.), and white  
179 guava (*Psidium guajava*). All fruits were washed, peeled, and macerated using a mixer to obtain the pulp (without  
180 dilution with water).

181 The pulps were incubated with 3 U/mL of the enzyme at a ratio of 1:1 (v/v) at 40 °C for 4 h under agitation  
182 (140 rpm). Subsequently, the samples were boiled for 5 min for enzyme inactivation and centrifuged at 16,873g for  
183 15 min. The supernatant (juice) was used to determine the clarity of the juice, and the transmittance was recorded at  
184 650 nm using distilled water as a blank. For each fruit pulp, a control was prepared using pulp and denatured enzymes  
185 (1:1, v/v). The clarification is calculated as follows:

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

$$\% \text{ Clarification} = \frac{Tt - Tc}{Tc} \times 100$$

Where, Tt = test transmittance and Tc = control transmittance, as described by Rosmine et al. [15].

## 2.6 Optical microscopy

Control (without enzyme treatment) and pectinase-clarified mango juice pulp samples were homogenized using a magnetic stirrer at 500 rpm for 5 min. Furthermore, 50  $\mu$ L of 0.002% ruthenium red was added to 2 mL of each sample. From each sample (control and treated), 50  $\mu$ L of stained solution was taken and spread smoothly and evenly on the observation slide. The samples were observed using a Leica DM5500 B optical microscope (Leica, Wetzlar, Germany) at 20 $\times$  magnification.

## 2.7 Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate, one-factor-at-a-time (OFAT) and the values obtained are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Substrate specificity and clarification data from fruit juices were subjected to one-way analysis of variance. Means were compared using Tukey's *post hoc* test, and differences were considered significant at  $P < 0.05$ . Statistical analyses were performed using the software SISVAR 5.6 [16] and GraphPad Prism version 8.0 (San Diego, CA, USA).

# 3. RESULTS

## 3.1 Production of extracellular pectinases by *A. japonicus*

The production of pectinases by *A. japonicus* was evaluated using different carbon sources through SmF [liquid culture media (agitated and stationary)] and SSF (Table 1).

The best production of pectinase was observed with passion fruit peel in SSF (3 U/mL), which yielded 2-fold higher enzyme than SmF (1.33 U/mL). Similarly, when mate herbs were used, SSF produced a higher yield (2.11 U/mL: fine mate yerba mate; 1.88 U/mL: fine medium tereré yerba mate; 0.73 U/mL: tereré thick yerba mate) than SmF (0.04 U/mL: fine mate yerba mate; 0.09 U/mL: fine medium tereré yerba mate; 0.17 U/mL: tereré thick yerba

1  
2  
3  
4 213 mate). A similar result was obtained with wheat bran (production: 1.04 U/mL with SSF and 0.82 U/mL with SmF)  
5  
6 214 and soybean flour (production: 1.47 U/mL with SSF and 0.72 U/mL with SmF).  
7

8 215 However, some sources were good inducers of the enzyme during SmF, such as extruded orange peel (1.55  
9  
10 216 U/ml – stationary) as well as cassava flours (cassava flour from Furnas do Dionisio/MS, cassava flour from  
11  
12 217 Rondonópolis/MT, coarse cassava flour from Pará, coarse cassava flour from Cuiaba/MT, and coarse cassava flour  
13  
14 218 Cruzeiro do Sul/Acre), with U/mL values up to 1.11 U/mL. Corn husks also showed better production during SmF  
15  
16 219 (1.18 U/mL) than that for SSF (0.71 U/mL). SmF production was better under stationary conditions than under  
17  
18 220 agitation for almost all carbon sources tested, except for FFD.  
19

20 221 Considering that passion fruit peel with SSF was the best carbon source for pectinase production and the  
21  
22 222 second-best source for inducing SmF production (Table 1), this carbon source was used in further experiments.  
23  
24 223 Pectinase was produced using passion fruit peel in solid medium after 48 h of cultivation (4.15 U/mg of protein) [17]  
25  
26 224 for biochemical characterization of the enzyme.  
27

28 225

## 30 226 3.2 Biochemical characterization

31 227

### 32 228 3.2.1 Effect of pH and temperature

33 229 Pectinase showed maximum activity at pH 4.0 in both 100 mM sodium acetate and McIlvaine buffers (Fig.  
34  
35 230 1A), maintaining more than 50% activity at a pH range of 3.0–5.5. For values above these, we observed a >80%  
36  
37 231 decrease in activity. As this pH range (3.0–5.5) is commonly observed in many fruit juices, the data obtained suggest  
38  
39 232 that this extract has potential for application in the clarification of fruit juices.  
40  
41

42 233 The effect of temperature on pectinase activity was evaluated at a temperature range of 35–70 °C using 100  
43  
44 234 mM sodium acetate buffer (pH 4.0). The optimum temperature was 60 °C, with a decrease of only 10% at 65 °C while  
45  
46 235 maintaining 50% activity at 70 °C (Fig. 1B).  
47  
48

49 236 This result is interesting because high temperatures are commonly used in various industrial processes for  
50  
51 237 different purposes; in most of these processes, the heated material must be cooled before enzymatic treatment [18].  
52  
53 238 Thus, the use of high-temperature tolerant pectinases, such as *A. japonicus* pectinase, could eliminate the cooling step  
54  
55 239 and reduce the final costs of the process.  
56  
57

58 240

59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

### 241 3.2.2 Effect of pH and temperature on stability

242 The stability of pectinase was evaluated at different pH, and the enzyme was observed to be stable for 4 h at  
243 all tested pH, and maintained 88%, 84%, and 72% of its activity at pH 3.0, 4.0, and 5.0, respectively, after 24 h. At  
244 pH 6.0, the enzyme still maintained 55% of its initial activity after 24 h (Fig. 1C).

245 The thermostability was measured using assays at different temperatures, in which the enzyme activity was  
246 measured after a 6 h incubation period at 25, 50, and 55 °C (Fig. 1D). Pectinase remained stable for 6 h (91% of the  
247 initial activity) at 25 °C, and at 50 °C, the enzyme maintained 71% activity for 6 h. However, at a temperature of 55  
248 °C, the half-life of the enzyme was reached in the first 10 min (50.2%), and later decreased gradually with increasing  
249 incubation time until reaching 8.5% after 6 h.

250

### 251 3.3 Application of pectinase in the clarification of fruit juices

252 Pectinases and other depolymerizing enzymes are widely used in the fruit and vegetable processing industry  
253 to hydrolyze sugars, thereby reducing their viscosity and giving the final product a crystalline appearance, in addition  
254 to increasing the juice yield and reducing the filtration time by up to 50% [19]. Considering the importance of  
255 pectinases in the juice clarification process, *A. japonicus* pectinase was used for clarification of juice pulps from 13  
256 different fruits at a ratio of 1:1 during 4 h of incubation at 40 °C (Table 2).

257 *A. japonicus* pectinase was superior to the commercial pectinase (Pectinex) in all the fruits tested. Of the  
258 different pulps used, *A. japonicus* pectinase achieved the best clarification in mango (Haden) at 85.56%, whereas  
259 Pectinex only clarified 50.89%. Moreover, for apple (Argentina), *A. japonicus* pectinase showed 66.32% clarification,  
260 whereas Pectinex only showed 12.67% clarification. Furthermore, for apple (Europe), banana “da terra”, mango  
261 (Palmer), and white guava, *A. japonicus* pectinase showed 52.59%, 49.04%, 46.7%, and 46.4% clarification,  
262 respectively, whereas Pectinex showed lower or significantly similar results with 13.34%, 38.29%, 49.3%, and 33.6%  
263 clarification for the same pulps, respectively.

264 The mango pulp clarification results are shown in Fig. 2A, where clarification obtained on treatment with *A.*  
265 *japonicus* pectinase (right) is compared to the control (left). Pectin degradation in mango pulp was also observed under  
266 the microscope, where a reduction in this polysaccharide was observed when treated with pectinase (Fig. 2B and 2C).

267

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

### 268 3.3.1 Effect of treatment time and concentration on clarification of mango juice

269 Different treatment times were evaluated (30–240 min) for the clarification of mango pulp using *A. japonicus*  
270 pectinase (Fig. 3A). After 1 h of incubation, the clarification percentage at 50 °C reached 32.7%, while it was  
271 approximately 16.5% at 40 °C. The clarification peak was reached after 2 h of incubation, when 48.7% (50 °C) and  
272 43.4% (40 °C) clarification was achieved, with no increase after 4 h of incubation. Therefore, 2 h of incubation was  
273 sufficient for the degradation of all pectin present in the mango juice, as there was no difference in the clarification  
274 percentage with increasing incubation time.

275 Different concentrations of *A. japonicus* pectinase were tested in mango juice for 4 h at 40 and 50 °C (Fig. 3B).  
276 An increase in the amount of enzyme resulted in an increase in the clarification percentage, reaching 41.9% at an  
277 enzyme concentration of 3 U/mL. Clarification was better at 40 °C at low enzyme concentrations, equating the  
278 percentages at the two temperatures at higher enzyme concentrations (2.25 and 3 U/mL).

279

## 280 4. DISCUSSION

281 The production of pectinases by fungi during SmF and SSF has been extensively studied [20, 21, 3]. As this  
282 process occurs in the near absence of water or any liquid, the increase in the production of polygalacturonase during  
283 SSF, compared to SmF, may be attributed to the expression of a second polygalacturonase during SSF, which is  
284 biochemically different from that produced during SmF [9].

285 Among the several species of fungi reported in the literature for pectinase production from agro-industrial  
286 residues, those of the genus *Aspergillus* sp. are the most cited, including *A. aculeatinus* with beet pulp and rapeseed  
287 meal as carbon source in SSF [3]; *A. niger* with wheat bran in SmF [20]; *A. fumigatus* with banana peel in SSF and  
288 SmF [22]; *A. niger* with orange and sugarcane bagasse in SSF [7]; *A. aculeatus* with passion fruit peel in SmF [1]; *A.*  
289 *japonicus* in sugarcane bagasse in SmF [23]; *A. niveus* with apple peel, orange peel, and passion fruit peel in SmF and  
290 with wheat bran and apple peel in SSF [24].

291 In the literature is described a wide variety of growth times to produce pectinases by fungi. Like the *A.*  
292 *japonicus* used in the present study, *A. aculeatinus* also shows maximum pectinase production at 46 h of fermentation  
293 [3]. *Aspergillus* spp. produced pectinase also with 48 h of fermentation [25]. *A. aculeatus* and *A. niveus* show  
294 maximum production after 96 h of fermentation [24], while *A. niger* shows maximum production only after 144 h of  
295 fermentation [20]. Furthermore, *A. japonicus* produces only 0.53 U/mL of pectinase after 168 h of fermentation [23].

1  
2  
3  
4 296 Fungal pectinases reportedly show high enzymatic activity at slightly acidic pH (3.0–5.5), approaching the  
5  
6 297 pH value of many fruit juices and optimal temperatures between 30 and 50 °C [26], consistent with the results of this  
7  
8 298 study. Similar results were reported in a study with *A. fumigatus* using banana peel as a carbon source, where it was  
9  
10 299 observed that the pectinase produced via SSF exhibited optimal activity at 60 °C, and the optimal pH of pectinase was  
11  
12 300 5.0 [22]. Sudeep et al. [25] reported a pectinase from *Aspergillus* sp. with optimal temperature of 30 °C and pH 5.8.  
13  
14 301 Another study with an exo-pectinase produced by *A. niger* also showed maximum activity at pH 4.0 but at optimal  
15  
16 302 temperatures of 40 and 50 °C, with a small drop-in activity at 60 °C [27]. The pectin lyase from *A. niveus* have an  
17  
18 303 optimal temperature of 55 °C and pH of 8.5 [24].

20 304 Several studies have reported the use of fungal pectinases in fruit juice clarification [9, 28]. In clarification  
21  
22 305 tests of yellow cajú juice using the crude extract of *A. niger*, Rocha et al. [21] obtained a 36% reduction in the color  
23  
24 306 intensity of the juice.

26 307 Sandri et al. [27] found that the clarification of apple and blueberry juice with *A. niger* pectinase was similar  
27  
28 308 or superior to that with commercial pectinases, increasing the clarification of apple juice by almost 20%. The  
29  
30 309 clarification of apple, butiá palm, blueberry, and grape juices using crude extracts of *A. niger* and *Aspergillus oryzae*  
31  
32 310 showed similar or superior results compared to that with commercial pectinases [29]. Barman et al. [30] also studied  
33  
34 311 the clarification of banana juice using the crude extract of *A. niger* and the semi-purified pectinase at 35 °C and  
35  
36 312 reported an increase in the clarification of banana juice (absorbance: 0.45 and 0.10, respectively) along with turbidity  
37  
38 313 reduction. The loss of turbidity may indicate depolymerization of pectin by the action of pectinolytic extracts. This  
39  
40 314 process yields a soluble pectic substance that can be removed via flocculation, filtration, or centrifugation [21].

42 315 The clarification of banana juice [30] increases with increasing enzyme concentration. In studies of  
43  
44 316 pomegranate juice treated with different concentrations of the purified polygalacturonase enzyme (0, 10, 20, 40, and  
45  
46 317 80 U) produced by *A. niger* via SSF, it was observed that an increase in polygalacturonase concentration from 0 to 80  
47  
48 318 U increases the clarification of pomegranate juice from 6.8% to 24.6% at 30 °C [28].

50 319

## 53 320 5. CONCLUSION

54  
55 321 In this study, pectinase from *A. japonicus* was produced using passion fruit peel as the carbon source, thereby  
56  
57 322 reducing the production cost. Furthermore, the obtained pectinase was stable under diverse pH ranges. *A. japonicus*

58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 323 pectinase showed better results in the clarification of fruit juices when compared to the commercial enzyme (Pectinex),  
5  
6 324 making it an excellent candidate for use in the food industry, especially in the wine and fruit juice industry.  
7  
8 325  
9  
10 326 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**  
11  
12 327 N.C.A.G, N.N.G., M.P.G.R., J.S.S.T., C.R.M. and, A.L.O.S.: Investigation, Methodology, Experimental work,  
13  
14 328 Conceptualization, Editing; R.M.S.G., Statistical Analysis; A.G.C., F.F.Z., D.C.M. and, G.C.G. Supervision, Writing  
15  
16 329 and Editing.  
17  
18 330  
19  
20 331 **ACKNOWLEDGEMENTS**  
21  
22 332 This work was part of Doctoral Thesis of Guimarães, NCA (Laboratory of Biochemistry and Microorganisms/ Federal  
23  
24 333 University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil). This paper was supported by grants from the Conselho  
25  
26 334 Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [CNPq Grant. 563823/2010-0 and 407732/2013-6, Brazil]  
27  
28 335 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Apoio ao  
29  
30 336 Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect). This study was  
31  
32 337 financed in part by the Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS/MEC - Brazil.  
33  
34 338  
35  
36 339 **DECLARATIONS**  
37  
38 340  
39  
40 341 **Conflict of interest**  
41  
42 342 The authors declared that they have no conflicts of interest to this work.  
43  
44 343  
45  
46 344 **Consent to participate**  
47  
48 345 The authors express their consent to cooperate in this article.  
49  
50 346  
51  
52 347 **Availability of data and material**  
53  
54 348 All data are described and available in the article.  
55  
56 349  
57  
58 350  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4 351 **Competing Interest**  
5  
6 352 The authors declare that they have no competing interests  
7  
8 353  
9  
10 354 **REFERENCES**  
11  
12 355  
13  
14 356 [1] Silva, J.D.C., de França, P.R.L., de Melo, A.H.F., Neves-Petersen, M.T., Converti, A., Porto, T.S.: Optimized  
15  
16 357 production of *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonases for pectin hydrolysis in hogplum (*Spondias*  
17  
18 358 *mombin* L.) juice. *Process Biochem.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.014>  
19  
20 359  
21  
22 360 [2] Contato, A.G., de Oliveira, T.B., Aranha, G.M., de Freitas, E.N., Vici, A.C., Nogueira, K.M.V., de Lucas, R.C.,  
23  
24 361 Scarcella, A.S.A., Buckeridge, M.S., Silva, R.N., Polizeli, M.L.T.M.: Prospection of fungal lignocellulolytic enzymes  
25  
26 362 produced from jatoba (*Hymenaea courbaril*) and tamarind (*Tamarindus indica*) seeds: Scaling for bioreactor and  
27  
28 363 saccharification profile of sugarcane bagasse. *Microorganisms.* (2021).  
29  
30 364 <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030533>  
31  
32 365  
33  
34 366 [3] Garzon, D.C., Habrylo, O., Lemaire, A., Guillaume, A., Carré, Y., Millet, C., Fourtot-Brun, C., Trezel, P., Le  
35  
36 367 Blond, P., Perrin, A., Georgé, S., Wagner, M., Coutel, Y., Levavasseur, L., Pau-Roblot, C., Pelloux, J.:  
37  
38 368 Characterization of a novel strain of *Aspergillus aculeatinus*: From rhamnogalacturonan type I pectin degradation to  
39  
40 369 improvement of fruit juice filtration. *Carbohydr. Polym.* (2021). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117943>  
41  
42 370  
43  
44 371 [4] Picot-Allain, M.C.N., Ramasawmy, B., Emmambux, M.N.: Extraction, characterisation, and application of pectin  
45  
46 372 from tropical and sub-tropical fruits: a review. *Food. Rev. Int.* (2022).  
47  
48 373 <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1733008>  
49  
50 374  
51  
52 375 [5] Polizeli, M.L.T.M., Damásio, A.R.L., Maller, A., Cabral, H., Polizeli, A.: Pectinases produced by microorganisms.  
53  
54 376 In: POLIZELI, M. L. T. M.; Rai, M. (Org.). *Fungal Enzymes*, 1ed. Boca Raton. USA: CRC Press, v. 316-340 (2013)  
55  
56 377  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

460 [28] Patidar, M.K., Nighojkar, S., Kumar, A., Nighojkar, A.: Production of polygalacturonase using *Carica papaya*  
461 peel biowaste and its application for pomegranate juice clarification. *Environ. Sustain.* (2020).  
462 <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00138-6>

463  
464 [29] Sandri, I.G., Fontana, R.C., Barknecht, D.M., Silveira, M.M.: Clarification of fruit juices by fungal pectinases.  
465 *LWT - Food Sci. Technol.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.02.008>

466  
467 [30] Barman, S., Sit, N., Badwaik, L.S., Deka, S.C.: Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa*  
468 *balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice. *J. Food Sci. Technol.* (2015).  
469 <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1413-8>

470

#### 471 **Figure legends**

472 **Fig. 1 (A-D).** Influence of pH and temperature on the activity and stability of *Aspergillus japonicus* pectinase. (A)  
473 Optimum pH for pectinase activity was determined using McIlvaine (pH 3.0–6.5), sodium acetate (pH 4.0–5.5),  
474 HEPES (pH 7.0–8.0), and Trizma HCl (pH 8.0–9.0) buffers at 60 °C. (B) Enzyme activity was evaluated at 35–70 °C  
475 at the already established optimum pH. (C) Effect of pH on pectinase stability was determined by incubating the  
476 enzyme at pH 3.0–6.0 for up to 24 h without substrate. (D) Thermostability of the enzyme was evaluated at 25, 50,  
477 and 55 °C for up to 6 h. Aliquots were collected at the indicated time points for the measurement of residual enzymatic  
478 activity in the stability tests. Relative and residual activities were calculated as a percentage of maximum activity  
479 (100%). All experiments were performed in triplicate, and the values obtained are expressed as the mean ± standard  
480 deviation (SD).

481

482 **Fig. 2 (A-C).** Clarification of mango juice using *Aspergillus japonicus* pectinase. (A) Control (left) and treated (right)  
483 mango pulp; (B) Control - untreated; (C) Treated with *A. japonicus* pectinase. Slide photos (stained with 0.002%  
484 ruthenium red) were taken at 20× magnification using a light microscope.

485

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

486 **Fig. 3 (A-B).** Clarification of mango juice using *Aspergillus japonicus* pectinase. (A) Incubation times ranging from  
487 30 min to 240 min were tested at 40 °C (●) and 50 °C (■) using 3 U/mL pectinase; (B) Clarification of mango juice  
488 using *A. japonicus* pectinase at different enzyme concentrations till 3 U/mL at 40 °C (●) and 50 °C (■).

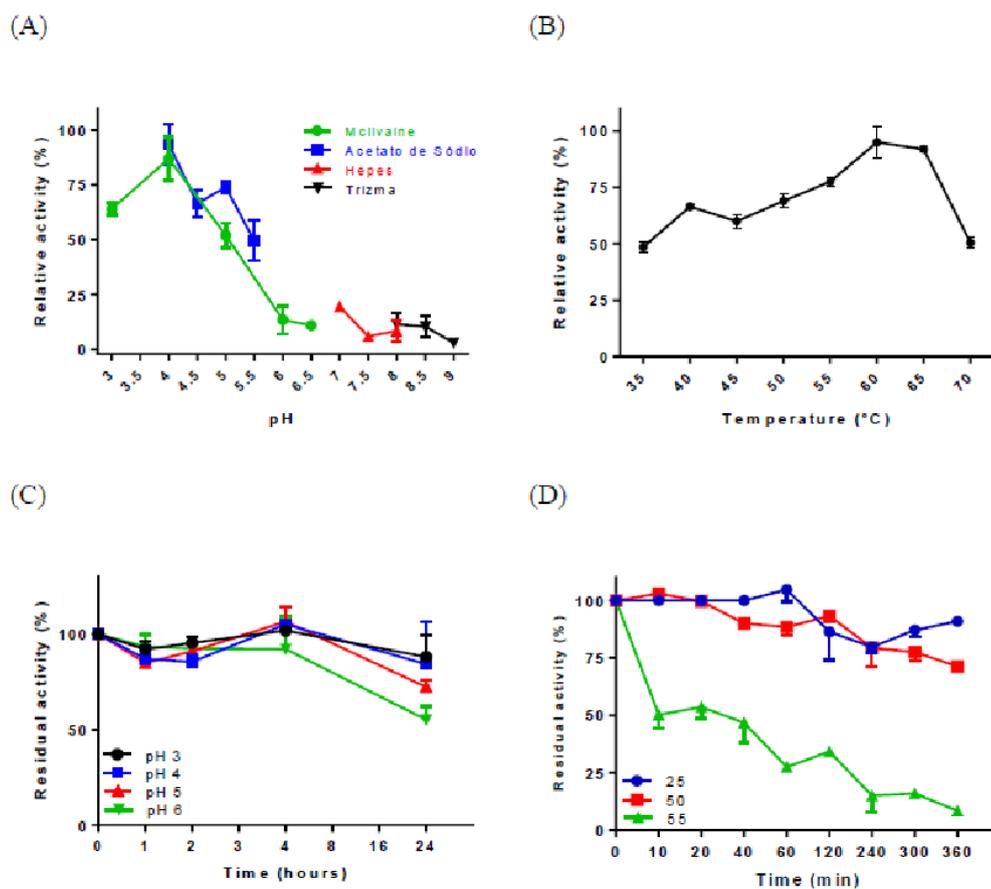


Fig. 1 (A-D).



Fig. 2 (A-C).

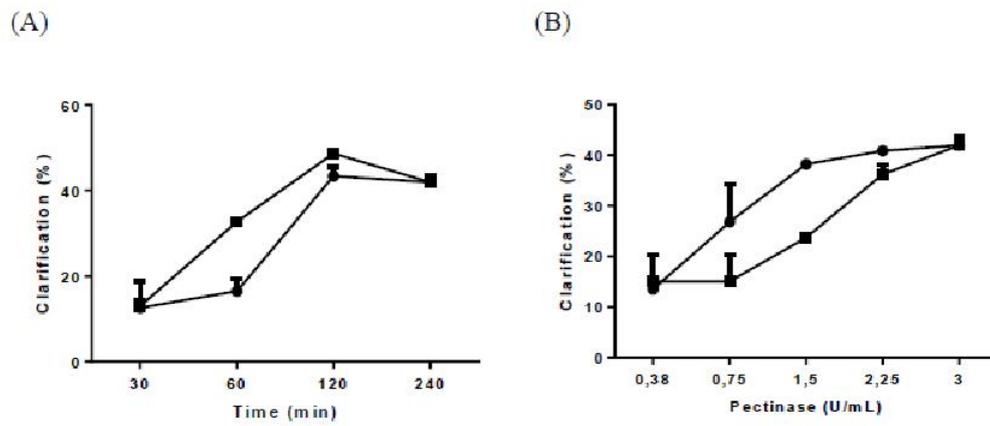


Fig. 3 (A-B).

**Table 1** - Production of pectinases by *A. japonicus* using different carbon sources

CARBON SOURCE	Submerged fermentation		Solid state fermentation
	Agitated	Stationary	
	U/ml	U/ml	U/ml
1- POPE	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	Nd
2- POPO	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00	Nd
3- PFPF	1,28 ±0,07 <sup>a</sup>	1,33 ±0,08 <sup>ab</sup>	3,02 ±0,33 <sup>a</sup>
4- EOP	1,48 ±0,05 <sup>a</sup>	1,55 ±0,23 <sup>a</sup>	0,20 ±0,03 <sup>e</sup>
5- FMYM	0,09 ±0,05 <sup>cd</sup>	0,38 ±0,03 <sup>efgh</sup>	0,69 ±0,23 <sup>de</sup>
6- FMTYM	0,10 ±0,02 <sup>cd</sup>	0,48 ±0,01 <sup>efgh</sup>	0,44 ±0,08 <sup>de</sup>
7- CTYM	0,09 ±0,05 <sup>cd</sup>	0,66 ±0,08 <sup>efg</sup>	0,12 ±0,04 <sup>e</sup>
8- UFMYM	0,02 ±0,03 <sup>d</sup>	0,04 ±0,02 <sup>i</sup>	2,11 ±0,27 <sup>b</sup>
9- UFMTYM	0,06 ±0,05 <sup>cd</sup>	0,09 ±0,03 <sup>hi</sup>	1,88 ±0,11 <sup>b</sup>
10- UCTYM	0,06 ±0,05 <sup>cd</sup>	0,17 ±0,04 <sup>hi</sup>	0,73 ±0,11 <sup>de</sup>
11- CFFD	0,92 ±0,10 <sup>b</sup>	0,75 ±0,05 <sup>cdef</sup>	0,18 ±0,09 <sup>e</sup>
12- CFR	0,16 ±0,05 <sup>cd</sup>	0,87 ±0,31 <sup>cde</sup>	0,35 ±0,14 <sup>de</sup>
13- CCFP	0,13 ±0,07 <sup>cd</sup>	1,11 ±0,02 <sup>abcd</sup>	0,60 ±0,40 <sup>de</sup>
14- CCFC	0,12 ±0,06 <sup>cd</sup>	0,75 ±0,08 <sup>cdef</sup>	0,30 ±0,14 <sup>e</sup>
15- CF	0,21 ±0,14 <sup>cd</sup>	0,28 ±0,05 <sup>ghi</sup>	Nd
16- CCFCFS	0,06 ±0,02 <sup>cd</sup>	0,75 ±0,03 <sup>cdef</sup>	0,38 ±0,03 <sup>de</sup>
17- WB	0,13 ±0,02 <sup>cd</sup>	0,82 ±0,21 <sup>cdef</sup>	1,04 ±0,16 <sup>cd</sup>
18- G	0,12 ±0,07 <sup>cd</sup>	0,90 ±0,04 <sup>bcd</sup>	Nd
19- ESB	0,10 ±0,05 <sup>cd</sup>	0,15 ±0,08 <sup>hi</sup>	Nd
20- CH	0,76 ±0,09 <sup>b</sup>	1,18 ±0,07 <sup>abc</sup>	0,71 ±0,05 <sup>de</sup>
21- SF	0,31 ±0,08 <sup>c</sup>	0,72 ±0,01 <sup>defg</sup>	1,47 ±0,16 <sup>bc</sup>
CV (%)	20,20	16,23	20,56

Abbreviations of carbon sources (1%): powdered orange peel (1-POPE); powdered orange pomace (2-POPO); powdered passion fruit peel (3-PFPF); extruded orange peel (4-EOP); fine mate yerba mate (5-FMYM); fine medium tereré yerba mate (6-FMTYM); coarse tereré yerba mate (7-CTYM); used fine mate yerba mate (8-UFMYM); used fine medium tereré yerba mate (9-UFMTYM); used coarse tereré yerba mate (10-UCTYM); cassava flour from Furnas do Dionisio/MS (11-CFFD); cassava flour from Rondonópolis/MT (12-CFR); coarse cassava flour from Pará (13-CCFP); coarse cassava flour from Cuiabá (14-CCFC); corn flour (15-CF); coarse cassava flour Cruzeiro do Sul/Acre (16-CCFCFS); wheat bran (17-WB); glucose (18-G); exploded sugarcane bagasse (19-ESB); corn husk (20-CH); and soy flour (21-SF). Caption: Nd – not determined. Values are means ± standard deviations of 3 replicates; and the means followed by the same letter in the column do not differ statistically by the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

**Table 2** – Fruit juice clarification using *A. japonicus* pectinase and a commercial pectinase (Pectinex).

Fruits (in nature)	FRUIT JUICE CLARIFICATION (%)		Fruit juice pH
	Pectinase	Pectinex	
Apple (Argentina)	66.32 ±15.7 <sup>a</sup>	12.67±1.0 <sup>b</sup>	4.1-4.5
Apple (Europe)	52.59 ±0.0 <sup>a</sup>	13.34 ±4.5 <sup>b</sup>	3.9-4.3
Apple (Grandsmith)	30.67 ±1.2 <sup>a</sup>	5.10 ±0.4 <sup>b</sup>	3.8-4.2
Banana (“da terra”)	49.04 ±2.8 <sup>a</sup>	38.29 ±3.7 <sup>a</sup>	4.2-4.6
Banana (“nanica”)	19.6 ±0.3 <sup>a</sup>	15.6 ±0.5 <sup>a</sup>	4.8-5.5
Mango (Haden)	85.56 ±6.0 <sup>a</sup>	50.89 ±8.4 <sup>b</sup>	3.7-4.1
Mango (Palmer)	46.7 ±1.0 <sup>a</sup>	49.3 ±1.8 <sup>a</sup>	4.1-4.5
Mango (Tommy)	16.6 ±0.1 <sup>b</sup>	21.2 ±1.4 <sup>a</sup>	3.7-3.9
Peach	9.47 ±0.2 <sup>a</sup>	5.20 1.2 <sup>b</sup>	3.7-4.0
Pear (D’Anjou)	22.60 ±3.5 <sup>a</sup>	9.56 ±1.0 <sup>b</sup>	4.4-4.7
Pear (Portuguesa)	25.59 ±1.2 <sup>a</sup>	6.96 ±4.8 <sup>b</sup>	4.9-5.2
Pear (red)	13.85 ±1.6 <sup>a</sup>	8.41 ±1.5 <sup>a</sup>	4.1-4.5
White guava	46.4 ±0.6 <sup>a</sup>	33.6 ±1.7 <sup>b</sup>	3.7-3.9

The clarification (%) values were calculated following Rosmine et al. [15]. Pectinase – pectinase from *A. japonicus*; Pectinex – commercial pectinase. Values are given as the mean ± standard deviation and the different letters within each row indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

## APÊNDICE B – Polygalacturonase from *Aspergillus japonicus* (PGAj): Enzyme production using low-cost carbon source, biochemical properties and application in clarification of fruit juices

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 39 (2022) 102233



Contents lists available at ScienceDirect

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bab](http://www.elsevier.com/locate/bab)



### Polygalacturonase from *Aspergillus japonicus* (PGAj): Enzyme production using low-cost carbon source, biochemical properties and application in clarification of fruit juices

Nelciele Cavaliere de Alencar Guimarães, Nathalia Nunes Glienke, Rodrigo Mattos Silva Galeano, Roberto Ruller, Fabiana Fonseca Zanoelo, Douglas Chodi Masui, Giovana Cristina Giannesi\*

Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos-LBq, Instituto de Biociências-IBIO, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS, Campo Grande, MS, Brazil

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Pectinase  
Polygalacturonase  
*Aspergillus japonicus*  
Clarification of fruit juices  
Low cost carbon source

#### ABSTRACT

*Aspergillus japonicus* polygalacturonase (PGAj) was produced using passion fruit peel, a residue from the agricultural and juice industries, as a low cost carbon source. The biochemical properties of the enzyme and its application in the clarification of fruit juices were investigated. The maximum PGAj production was obtained using solid state fermentation (SSF) in 48 h ( $227.75 \pm 13.1$  U). PGAj was purified in two chromatography steps with a specific activity of 7.9 U/mg protein, 2.9-fold purification, and 81% final yield, exhibiting a molecular weight about 40 kDa. The optimal pH and temperature for PGAj activity were pH 4.0 and 55 °C, respectively. Moreover, the PGAj enzyme retained up to 90% of its initial activity for 4 h at pH 4.0, 5.0 and 6.0. The enzyme maintained 83% residual activity after 20 min at 50 °C. PGAj best preferred citrus pectin ( $8.45 \pm 1.6$  U/mg protein) as substrate. The best results for juice clarification using 3 U/mL PGAj were obtained with the pulp of Palmer and Tommy mango varieties, white guava, banana, and apple, with increases of 65%, 41%, 40%, 11%, and 9.4% in transmittance values, respectively, compared to the control. This was superior to that obtained using commercial pectinase for some of the pulps, as 49% and 21% for Palmer and Tommy mango pulps, respectively. Thus, PGAj may be suitable for application as a clarifying agent in the fruit juice industry.

#### 1. Introduction

Microorganisms are preferred sources for the production of industrial enzymes due to their rapid growth, easy availability, and amenability to genetic modification. Enzymes produced by fungi are extremely attractive for industrial application, especially because fungi are natural decomposers of organic matter. Due to their reproduction and growth characteristics, fungi can adapt to a wide range of substrates, including most decomposing plant materials, as they possess the necessary enzymatic repertoire for plant cell wall decomposition (de Lucas et al., 2020). Filamentous fungi are preferred enzyme sources because they have excellent extracellular protein secretion capacity. Fungal enzymes exhibit a broad spectrum of activity, high substrate specificity, and high stability,

\* Corresponding author. Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos-LBq, Instituto de Biociências-IBIO, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS, CEP: 79070-900, Campo Grande, MS, Brazil.  
E-mail address: [giannesigiovana@hotmail.com](mailto:giannesigiovana@hotmail.com) (G.C. Giannesi).

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102233>

Received 21 August 2021; Received in revised form 3 November 2021; Accepted 24 November 2021  
Available online 27 November 2021

and offer the advantages of safety, sustainability, and a higher reaction speed under milder conditions compared to conventional chemical-based industrial processes (Cologna et al., 2018; Chambergo & Valencia, 2016).

The low-cost production of pectinase from fungi can be achieved using agricultural and agro-industrial residues as carbon sources. Submerged fermentation (SmF) is predominantly used in industrial processes (90%) for pectinase production, mainly due to the ease of scale-up (Sandri et al., 2015), and therefore still studied by several researchers (Kaur et al., 2020; Silva et al., 2018; Ferreira et al., 2018). However, studies on using solid state fermentation (SSF) for pectinase production have increased in recent years, due to the lower cost and higher enzyme production levels in SSF (Silva et al., 2018). SSF has been reported for pectinase production using different fungi and raw materials, such as *Aspergillus fumigatus* MS16 with banana peel as a carbon source (Zehra et al., 2020), *Aspergillus niger* with orange and sugarcane bagasse (Mahmoodi et al., 2019), *Aspergillus awamori* with orange peel (Marzo et al., 2018), and *Aspergillus giganteus* in a mixture of wheat bran, orange peel and lemon (Ortiz et al., 2016), among several others.

Cellulose, hemicellulose and pectin are the main polysaccharide components of the plant cell wall, and are major renewable resources (Li et al., 2015). Pectin is a complex high molecular weight polysaccharide located in the middle lamella and in the primary cell wall of plants, and is a major constituent of cereals, vegetables, fruits and fibers. A mixture of pectic substances exist in nature, which are classified based on the types of modifications in the pectin main chain. The major linear portion of pectin is homogalacturonan, a polymer of  $\alpha$ 1,4-linked galacturonic acid, which is partially esterified. The branched portion exhibits side chains formed mainly by sugars such as rhamnose, galactose, arabinose, and xylose (Barreto, 2016).

Enzymes that hydrolyze pectic substances are widely known as pectinases, and are classified depending on their mechanism of action. Pectinases have received worldwide attention in the current biotechnology era as ecofriendly biocatalysts, and lead the list of commercially produced enzymes with a 25% share of the global food and beverage enzyme market. Pectinases are generally enzyme blends including pectate-lyase, polygalacturonase, and pectinesterase (Amin et al., 2019). The 2017 *Global Pectinase Market research* report also showed an accelerated increase in the pectinase market share, with an average annual growth of 2.86%, and an estimated market size of \$ 35.5 million by 2021 (John et al., 2020). In the food industry, pectinases are applied in several processes, including (i) viscosity reduction of fruit pulp (in turn improving the extraction, filtration and clarification of juices), (ii) treatment of wastewater containing pectin material (Mahesh et al., 2016; Suhaimi et al., 2016), and (iii) extraction of oils from rapeseed (canola), sunflower seed, palm, and olive, thereby avoiding the use of carcinogenic hexane (Ortiz et al., 2016), among others. Fungi and yeasts mainly produce acidic pectinases, and the enzymes used for fruit juice clarification and wine production are often derived from fungal sources, especially filamentous fungi (Amin et al., 2019).

The use of pectinases in juice manufacture is necessary because fruits rich in pectin generate juices with high viscosity and turbidity, as pectin residues and other wall polysaccharides are dragged along during the separation process. Pectinases and other depolymerizing enzymes are widely used in the fruit and vegetable processing industry to hydrolyze polysaccharides to sugars, ultimately reducing the juice viscosity and giving a crystalline appearance to the final product, in addition to increasing juice yield and reducing filtration time by up to 50% (Dal Magro et al., 2019). As a result, the juice presents higher clarity, as well as more concentrated flavor and color, which are important parameters that affect its market value and general acceptance (Abdullah et al., 2007; Dey et al., 2014; Cerreti et al., 2001).

Several studies have explored the use of pectinases for the clarification of fruit juices through viscosity and turbidity reduction. Gani et al. (2020) reported between  $38.80 \pm 5.03\%$  and  $91.10 \pm 9.03\%$  clarification of pear juice using pectinase treatment. In another study, *A. niger* pectinase was used in the enzymatic treatment of strawberry juice, resulting in 60% lower turbidity and 40% reduced viscosity in the treated samples (Sandri and Silveira, 2018). The pectinase from *Aspergillus aculeatus* clarified apple (97.22%) and umbu (45.52%) juices (de Oliveira et al., 2018), and the *A. niger* polygalacturonase was used to clarify banana juice (Barman et al., 2015).

The present work aimed to produce the polygalacturonase (PGAj) from *Aspergillus japonicus* using passion fruit peel as carbon source in SSF. We also purified and characterized the biochemical parameters of the enzyme and studied its application in the clarification of different types of fruit juices.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganism, growth and maintenance

The filamentous fungus *A. japonicus* (UFMS 48.136) was isolated from the soil of Natural Heritage Private Reserve (RPPN) of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande/MS-Brazil and identified by Silva et al. (2019).

The strain was maintained by cultivating on potato-dextrose-agar (PDA) medium (Himedia, Mumbai, India) at 35 °C for a period of 4–10 days, and preserving on silica gel beads.

### 2.2. Polygalacturonase production

For the production of PGAj, passion fruit peel residue was used as a carbon source as previously standardized. PGAj production in SmF was evaluated in a modified SR liquid medium (Rizzatti et al., 2001) containing (w/v): 0.1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.4%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2% peptone, 0.025% yeast extract, 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05% KCl, 0.5%  $\text{NaNO}_3$ , 0.0003%  $\text{CaCl}_2$ , 0.00035%  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.0004%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , and 0.1% tween 80, in 100 mL of distilled water, initial pH 5.0. Cultivation was performed at 35 °C under stationary condition, with 1% (w/v) passion fruit peel added as carbon source.

SSF was performed following the method of Martins et al. (2013). The fungus was grown in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 5 g passion fruit peel as the carbon source and 10 mL salt solution (0.1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 0.1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). A suspension of spores from PDA-grown fungal culture was prepared in the salt solution and used as the inoculum ( $1 \times 10^6$  spores/mL). Cultivation was per-

formed under stationary condition at 35 °C. The grown cultures were resuspended in 50 mL distilled water and stirred for 30 min. The suspension was filtered through a sieve and centrifuged at 10,000 × g for 10 min at 4 °C, and the supernatant was used as the crude extract containing the PGAj activity.

### 2.3. Polygalacturonase assay and determination of protein concentration

Polygalacturonase activity was determined by incubating enzyme samples with 1% (w/v) citrus pectin (P9135, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, at 45 °C. At intervals of 5 min, the reaction was interrupted by thermal inactivation (10 min at 95 °C) and 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent (Merck, Darmstadt, Germany) was added. The amount of released reducing sugars was quantified using the method of Miller (1959) with a galacturonic acid standard curve (Sigma-Aldrich). One unit of activity (1 U) was defined as the amount of enzyme capable of releasing 1 μmol reducing sugars per minute. Protein concentration (in the crude extract and purified enzyme preparation) was determined using the Lowry method (Lowry et al., 1951) with bovine serum albumin (BSA) as protein standard. The specific activity was expressed as U/mg protein.

### 2.4. Growth time curve for polygalacturonase production

To determine the best growth time for maximum production of PGAj enzyme, the fungal strain was grown on passion fruit peel as carbon source in SmF and SSF, as described in section 2.2, for a period of 24 h–192 h under stationary condition at 35 °C. Aliquots were removed at 24 h intervals, and enzyme activity and protein concentration were determined as described in section 2.3.

### 2.5. Purification of PGAj

The crude extract containing PGAj enzyme was loaded onto a DEAE-fractogel anion exchange column (2.0 × 11.0 cm) previously equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. The proteins were eluted with a gradient of 0–1.0 M NaCl in the same buffer. Fractions (3.6 mL per tube) were collected and those that showed PGAj activity were pooled and dialyzed. Then, the peak containing the highest pectinase activity was equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 1.0 M ammonium sulfate, and loaded onto a Phenyl-sepharose CL-4B hydrophobic interaction chromatography column (2.0 × 8.5 cm) previously equilibrated in the same buffer. The proteins were eluted (3.6 mL per tube) with the same buffer without ammonium sulfate, generating a unique peak (200 mL) and were then pooled and dialyzed against water for further characterization.

### 2.6. Determination of PGAj purity

#### 2.6.1. SDS-PAGE and zymogram

The molecular mass and purity of PGAj were assessed using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS – PAGE) by loading 25 μg protein on a 15% polyacrylamide gel (Laemmli, 1970). After conducting denaturing electrophoresis, the gel was silver-stained according to the method of Blum et al. (1987). The molecular mass markers (#1610363, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were stained with Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma-Aldrich). To visualize the polygalacturonase activity (zymogram), the PGAj sample was separated using non-denaturing SDS-PAGE on a 15% gel. The gel was then incubated with McIlvaine buffer pH 4.0 containing citrus pectin (1% w/v) at 50 °C for 90 min. The gel was stained with ruthenium red (0.05%, w/v) for 30 min, and washed with distilled water until the activity band of polygalacturonase was visualized as a clear area.

#### 2.6.2. Native PAGE and zymogram

To verify the homogeneity of the purified PGAj, electrophoresis was performed under native conditions with 50 μg protein on a 10% polyacrylamide gel (PAGE 8.9) according to the method of Davis (1964), followed by silver staining (Blum et al., 1987).

The enzyme (10 μg) was submitted to the zymogram technique through electrophoresis on a pH 8.9 PAGE gel (10%) copolymerized with 0.1% (w/v) citrus pectin, as described by Cruickshank and Wade (1980). After the run, the gel was stained with ruthenium red (0.05%, w/v) for 30 min and washed with distilled water until the activity band of polygalacturonase was visualized as a clear area.

### 2.7. Biochemical characterization of purified PGAj

#### 2.7.1. Determination of optimum pH and temperature for PGAj activity

The optimum pH for PGAj activity was determined at 60 °C by incubating the enzyme with 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.0–5.5), Hepes buffer (pH 7.0–8.0), Tris. HCl buffer (pH 8.0–9.0), and McIlvaine buffer (pH 3.0–6.5), containing 1% (w/v) citrus pectin as substrate.

The optimal temperature for PGAj activity was determined by incubating the reaction mixtures at different temperatures (40–70 °C) in McIlvaine buffer pH 4.0. The relative activity was calculated as a percentage of the maximum activity.

#### 2.7.2. Effect of pH and temperature on PGAj stability

The pH stability was evaluated by incubating PGAj for 24 h in McIlvaine buffer (pH 3.0–6.0) in the absence of the substrate at 4 °C. Aliquots were taken after 1, 2, 4, and 24 h, and enzyme activity was assayed. Thermostability was evaluated by incubating only the enzyme at 50 °C and 55 °C, with aliquots taken after 10, 20, 40, 60, 120, and 240 min for activity assay. The half-time ( $t_{1/2}$ ) for the enzymic reaction was defined as the time taken for the concentration of substrate to decrease to half its value at any given point in time (Bell and Bell, 1988).

PGAj activity assays were performed as described in section 2.3, and these results were expressed as relative activity, which is calculated as a percentage of the maximal activity.

### 2.7.3. Substrate specificity of the PGAj enzyme

The substrate specificity was analyzed by incubating the PGAj in McIlvaine buffer, pH 4, with 1% (w/v) of each substrate: citrus pectin (P9135, Sigma), apple pectin (P93854, Sigma), polygalacturonic acid (P3888, Sigma), birchwood xylan (X0502, Sigma), oat spelts xylan (X0627, Sigma), starch, sucrose, and casein. The assays were performed as described in section 2.3. PGAj activities on the substrates were expressed relative to that on citrus pectin (100%).

### 2.8. Application of the PGAj enzyme for clarification of fruit juices

To evaluate the potential application of PGAj enzyme for the clarification of fruit juices, 13 different fruits were used: acerola (*Malpighia emarginata*), banana (*Musa acuminata* 'Dwarf Cavendish'), white guava (*Psidium guajava*), guavira (*Campomonesia adamantium*), pear orange (*Citrus sinensis*), gala apple (*Malus communis*), papaya (*Carica papaya*), Palmer mango (*Mangifera indica* L. cv. Palmer), Tommy mango (*Mangifera indica* L. var. Tommy Atkins), melon (*Cucumis melo*), ponkan (*Citrus reticulata*), isis (*Vitis vinifera* L.) and victory grapes (*Vitis vinifera* L.). All fruits were purchased in markets, washed, peeled and macerated using a blender, and sieved to obtain the natural pulps (without addition of water).

Pulp samples (2 mL) were individually incubated with 3 U/mL enzyme (PGAj or Pectinex) at a ratio of 1:1 (v/v), for 4 h at 40 °C and 50 °C with 140 rpm agitation. The samples were then boiled for 5 min to inactivate the enzyme and centrifuged at 16,873 × g for 20 min at 25 °C. The supernatant was analyzed to determine the clarity of the juice, by recording the transmittance at 650 nm against a distilled water blank using a Genesys 10S UV-vis spectrophotometer. For each fruit pulp, a control reaction was performed with the pulp and inactivated enzyme (1:1, v/v). Clarification was calculated as follows:

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

where  $T_t$  = treated transmittance and  $T_c$  = control transmittance, as described by Rosmine et al. (2017).

### 2.9. Reproducibility of results

All assays were performed in triplicate, one-factor-at-a-time (OFAT) experiments and the values obtained were expressed as mean ± standard deviation (SD). The substrate specificity and fruit juice clarification data were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA). Means were compared by Tukey's *post hoc* test and differences were considered significant at  $p < 0.05$ . SISVAR 5.6 (Ferreira, 2011) and GraphPad Prism version 8 (San Diego, California, USA) software were used for the analysis.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Growth and polygalacturonase production by *A. japonicus*

The fungus used in this study was identified by genomic analysis as showing 98% identity to *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus* (NCBI accession MH567078). The DNA sequence (cluster region ITS1-5.8S-ITS4) of this isolated strain was deposited under accession number MW587714 in the NCBI database.

The carbon source used in this study for PGAj production was the passion fruit peel, which it has been used by other authors to produce pectinases from *A. aculeatus* URM4953 (Silva et al., 2018) and *Penicillium janthinellum* VI2R3M (Pagnonceli et al., 2019).

The optimum growth time for PGAj enzyme production was determined using passion fruit peel as the carbon source in SSF and SmF. Maximum PGAj production was achieved after 48 h in SSF (227.75 ± 13.1 U), which decreased on further incubation. The enzyme production achieved using SmF (41.31 ± 3.80 U after 192 h) was considerably lower than that achieved using SSF throughout the period of cultivation (Fig. 1).

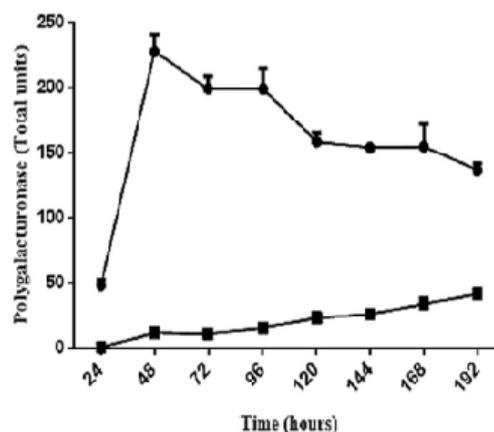


Fig. 1. Effect of growth time on polygalacturonase production. *A. japonicus* was grown on passion fruit peel as a carbon source in SSF (5 g) and SmF (1% w/v) under stationary condition at 35 °C, as described in section 2.2. Legend: (●) SSF; (■) SmF.

A wide variety of growth times have been reported for the production of pectinases by fungi in the literature. Similar to PGAj in the present work, *Aspergillus aculeatinus* also produced pectinase with 46 h fermentation in SSF (Garzon et al., 2021), and *Penicillium griseooreum* exhibited a pectinase production peak at 48 h (Piccoli-Valle et al., 2001). Camargo et al. (2005) studied the production of pectin lyase from *Aspergillus* sp. isolated from the soil, which showed a production peak after 68 h, while Sandri and Silveira (2018) showed that *A. niger* exhibited maximum pectinase production after 72 h.

### 3.2. Purification of PGAj enzyme

*A. japonicus* is considered a non-pathogenic fungus in the food industry (Silva et al., 2019) and is widely used as a producer of enzymes of industrial interest like pectinase, cellulase, and xylanase (Semenova et al., 2003; Li et al., 2015; Silva et al., 2019). The purification of fungal proteins is well studied. In this study, extracellular PGAj was purified from the culture supernatant using two chromatographic steps, resulting in a 2.9 - fold purification with 81% enzyme recovery and a specific activity of 7.9 U/mg protein (Table 1).

Several fungal pectinases have been previously purified using different methods. An extracellular polygalacturonase produced by *Penicillium notatum* was purified 3.07 - fold using a three-step purification procedure (Amin et al., 2017). The polygalacturonase from *P. janthinellum* VI2R3M was purified 3.1-fold using two chromatographic steps, albeit with low enzyme yields of 2.5% and 6.2%, respectively (Pagnonceli et al., 2019). However, the pectinase from *Aspergillus terreus* was semi-purified via ion exchange and size exclusion chromatography with a yield of 80% (Vaz et al., 2021), similar to that achieved in our study.

#### 3.2.1. PGAj electrophoretic profile and zymogram activity

The purified PGAj enzyme was analyzed on 15% SDS-PAGE gel to verify its molecular mass and its corresponding in-gel activity (Fig. 2B). The subunit molecular mass of PGAj was approximately 40 kDa. Through a zymogram in the same gel, it was possible to confirm the presence of at least one form of polygalacturonase with high enzyme activity (Fig. 2B).

Molecular masses of pectinases purified from fungi and bacteria range from 35 kDa to 115 kDa (Vaz et al., 2021). A previous study on *A. japonicus* also using an ion exchange column followed by Phenyl-sepharose for purification showed two polygalacturonases (PG I and II) with molecular masses 38 kDa and 65 kDa, respectively (Semenova et al., 2003). Studies on other fungal species have shown molecular masses of pectinases close to those found in the present study, viz. 37 kDa (Cheng et al., 2017; Yuan et al., 2011), 42 kDa (Sassi et al., 2016), 45 kDa (Tounsi et al., 2016), and 50 kDa (Vaz et al., 2021).

Native PAGE on a 10% gel (Laemmli, 1970) was used to check the homogeneity of the purified enzyme, which revealed a single protein band (Fig. 2C). Polygalacturonase activity staining was also performed by incorporating citrus pectin in the native PAGE gel, in which a clear zone was obtained (Fig. 2D).

Table 1  
Purification of PGAj enzyme.

Step	Volume (mL)	Total Activity (total U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Yield (%)	Purification fold
Crude extract	105	371	137	2.7	100	1.0
DEAE-fractogel	81	138	44	4.3	51	1.6
Phenyl-sepharose	200	301	38	7.9	81	2.9

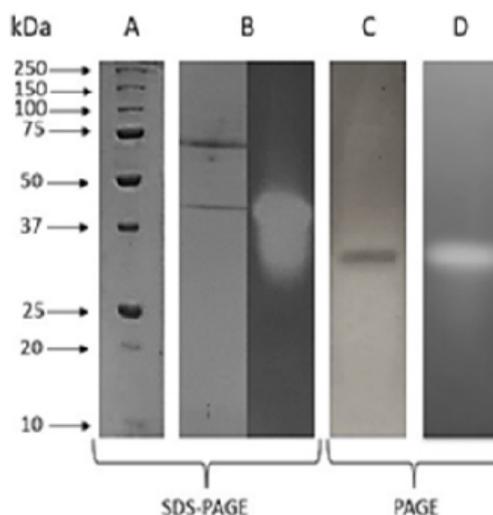


Fig. 2. Electrophoretic profile of purified PGAj. (A) Molecular mass marker: (Bio-Rad #1610363) stained with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue; (B) 15% (w/v) SDS-PAGE gel and zymogram (25 µg samples) purified PGAj, stained with silver and 0.05% (w/v) ruthenium red, respectively; (C) Silver-stained 10% (w/v) PAGE gel 50 µg enzyme; (D) Zymogram in 10% (w/v) PAGE gel stained with 0.05% (w/v) ruthenium red (10 µg).

### 3.3. Biochemical properties of the purified PGAj

#### 3.3.1. Optimal pH and temperature for the enzyme activity and stability

PGAj activity was evaluated over a range of pH and temperatures (Fig. 3). The enzyme showed maximum activity at pH 4.0 ( $51 \pm 0.1$  U/mg protein, considered 100%) and maintained 72% activity at pH 4.5 (Fig. 3A). Acidic polygalacturonases constitute a major fraction of pectinase preparations reported in literature, and are extensively applied in the clarification of fruits juice, vegetables extracts, and wines (Cheng et al., 2016). When PGAj was incubated at different temperatures, it exhibited maximum activity between 50 °C (93%) and 55 °C ( $5.5 \pm 0.1$  U/mg protein, considered 100%) (Fig. 3B).

Many other polygalacturonases from *Aspergillus* sp. have shown pH and temperature optima similar (Pedrolli et al., 2009) to those found in this work, including pH 4.0–5.5 for *A. japonicus* (Semenova et al., 2003), pH 4.0 and 50 °C for *A. niger* (Anand et al., 2017), and pH 5.0 and 55 °C for *A. awamori* CICC 2040 and *A. niger* SW06 polygalacturonases (Adedeji and Ezekiel, 2019).

In addition, PGAj was highly stable at pH 4.0–6.0, retaining its full initial activity after 4 h and approximately 75% of its initial activity after 24 h. The enzyme stability reduced at pH 3.0, with a 40% reduction in activity within 1 h, and 20% residual activity after 24 h (Fig. 3C).

The thermostability of PGAj was determined by measuring residual enzyme activity after incubation at 50 °C and 55 °C (Fig. 3D). PGAj maintained 83% of its initial activity after 20 min at 50 °C, reaching its half life after 120 min incubation, and still maintained 33% activity after 4 h. At 55 °C, the half-life of the enzyme was reached within approximately 70 min incubation, and the activity later reduced gradually to 33% after 4 h.

Fungal pectinolytic enzymes are reported to usually show greater thermostability in an acidic medium, similar to the PGAj enzyme. Polygalacturonase from a new strain of *P. janthineilum* V12R3M showed 100% stability at 50 °C and 80% stability at pH 3.0–pH 5.0 (Pagnonceli et al., 2019). The polygalacturonase from *Penicillium* sp. was acidophilic and stable in the pH range 4.0–5.0 (Yuan et al., 2011). *A. niger* showed a polygalacturonase activity stable for 2 h at 30 and 40 °C at pH 4.0–6.0 (da Câmara Rocha et al., 2020).

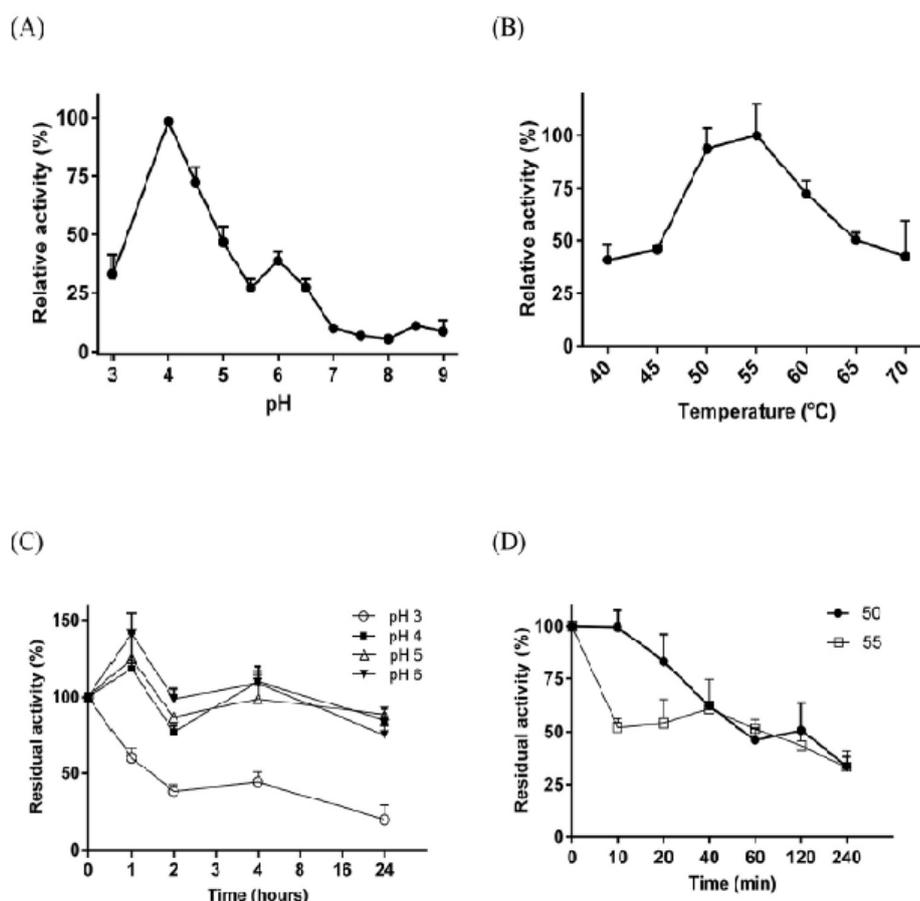


Fig. 3. Influence of pH and temperature on the activity and stability of PGAj. (A) Optimum pH for PGAj activity was determined using Mcllvaine (pH 3.0–6.5), Sodium acetate (pH 4.0–5.5), Hepes (pH 7.0–8.0) and Trizma (pH 8.0–9.0) buffers, at 60 °C; (B) Enzyme activity was evaluated at 40 °C–70 °C at the already established optimum pH; (C) Effect of pH on PGAj stability was determined by incubating the enzyme at pH 3.0–6.0 for up to 24 h without substrate; (D) Thermostability of the enzyme was evaluated at 50 °C and 55 °C for up to 4 h. Aliquots were removed at the indicated time points for the measurement of residual enzymatic activity in the stability tests. Relative and residual activities were calculated as a percentage of maximum activity (100%). All experiments were performed in triplicate and the values obtained are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

The polygalacturonase from *A. terreus* reached its half-life on 2 h incubation at 40 °C (Vaz et al., 2021), similar to the behavior of PGAj at 50 °C in the present study. The polygalacturonase from *P. oxalicum* was stable below 45 °C (Cheng et al., 2017).

### 3.3.2. Substrate specificity of PGAj

PGAj best preferred citrus pectin as substrate ( $8.45 \pm 1.6$  U/mg protein, considered 100%), followed by apple pectin ( $47\% \pm 21.2$ ) and polygalacturonic acid ( $20\% \pm 1.2$ ). No activity was detected for all other substrates tested (Table 2).

Previous reports have shown that pectinases exhibit different substrate affinities, according to the percentage of esterification of the substrates and degree of specificity of the enzyme. The polygalacturonase from *A. awamori* CICC 2040 preferred pectin as the best substrate for its activity (Adedeji and Ezekiel, 2019). The polygalacturonase of *Penicillium* sp. showed the highest relative activity (100%) for polygalacturonic acid, followed relative activities of 77.5%, 19.4%, and 9% on pectins with 34%, 70%, and 85% esterification, respectively (Yuan et al., 2011). The *P. janthinellum* VI2R3M polygalacturonase exhibited 100% activity on polygalacturonic acid, 55.5% on citrus pectin and showed no activity with CMC, Avicel, starch, and xylan (Pagnonceli et al., 2019).

### 3.4. Application of PGAj and commercial pectinase (Pectinex) for fruit juice clarification

#### 3.4.1. Clarification of different fruit juices

The purified PGAj was used for the clarification of 13 pulps of fruit juices in a 1 : 1 ratio during 4 h incubation at 40 °C and 50 °C (Table 3). We observed that the best clarification was obtained on Palmer mango juice pulp, with  $65.5 \pm 0.1\%$  juice clarification at both temperatures tested (Fig. 4). This result was superior to that obtained using commercial pectinase (Pectinex), which achieved  $49.3 \pm 1.8\%$  and  $51.5 \pm 0.1\%$  clarification at 40 °C and 50 °C, respectively. Similarly, the Tommy mango pulp was clarified  $41.1 \pm 0.9\%$  and  $21.2 \pm 1.4\%$  using PGAj and Pectinex, respectively, at 40 °C.

Both PGAj and the commercial pectinase showed similar activity against white guava and banana pulps, with  $40.2 \pm 1.3\%$  and  $10.8 \pm 0.3\%$  clarification achieved using PGAj and  $37.1 \pm 1.0\%$  and  $15.5 \pm 0.3\%$  using Pectinex, respectively. In contrast to mango pulp, PGAj could achieve only poor clarification of apple ( $9.4 \pm 0.7\%$ ), acerola ( $2.4 \pm 0.1\%$ ) and papaya ( $1.7 \pm 0.4\%$ ) pulps at 40 °C, which may be attributed to the low viscosity of these fruit pulps. With the other fruits tested (guavina, orange, melon, ponkan, isis grape, and victory grape), the control pulps (without treatment) already presented 100% transmittance, making it impossible to detect clarification after enzymic treatment.

In a previous study, the use of commercial pectinase (3.6 U/ml) was shown to increase the transmittance by more than 29.9% (Cheng et al., 2016). Gani et al. (2020) demonstrated  $38.80 \pm 5.03\%$  to  $91.10 \pm 9.03\%$  clarification of pear juice using pectinase-assisted extraction, employing optimal processing conditions of 1.90% enzyme concentration and incubation at 30 °C for 120 min. Yuan et al. (2011) applied polygalacturonase of *Penicillium* sp. for apple juice clarification, which increased the light transmittance by 71.8%.

**Table 2**  
Substrate specificity of PGAj.

Substrates (1%)	Relative activity (%) <sup>a</sup>
Pectin from citrus	100 <sup>a</sup>
Pectin from apple	$47 \pm 21.2^b$
Polygalacturonic acid	$20 \pm 1.2^b$
Xylan from birchwood	ND
Xylan from oat spelts	ND
Starch	ND
Sucrose	ND
Casein	ND

<sup>a</sup> Mean and standard deviations from triplicate experiments; Means followed by the same letter in column do not differ statistically by the Tukey's test ( $p < 0.05$ ); ND: not detected.

**Table 3**  
Fruit juice clarification using PGAj and a commercial pectinase (Pectinex).

Fruits (In nature)	40 °C		50 °C		Fruit Juice pH
	PGAj	Pectinase	PGAj	Pectinase	
Acerola	$2.4 \pm 0.1^a$	ND	$2.2 \pm 0.04^a$	ND	3.5–3.7
Banana	$10.8 \pm 0.3^b$	$15.6 \pm 0.5^a$	$7.4 \pm 0.3^a$	$15.5 \pm 0.3^a$	4.3–5.5
White guava	$29.9 \pm 2.4^b$	$33.6 \pm 1.7^{ab}$	$40.2 \pm 1.3^a$	$37.1 \pm 1.0^{ab}$	3.7–3.9
Apple	$9.4 \pm 0.7^a$	ND	$5.8 \pm 3.9^a$	ND	4.0–4.3
Papaya	$1.7 \pm 0.4^a$	ND	$1.1 \pm 0.5^a$	ND	4.1–5.0
Mango (Palmer)	$55.5 \pm 0.1^a$	$49.3 \pm 1.0^b$	$65.4 \pm 1.2^a$	$51.5 \pm 0.1^b$	4.1–4.5
Mango (Tommy)	$41.1 \pm 0.9^a$	$21.2 \pm 1.4^b$	$42.7 \pm 1.4^a$	$20.6 \pm 0.1^b$	3.7–3.9

ND - not determined. The clarification (%) values were calculated following Rosmine et al. (2017). PGAj - purified polygalacturonase from *A. japonicus*; Pectinase - commercial pectinase (Pectinex). Values are given as the mean  $\pm$  standard deviation and the different letters within each row indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

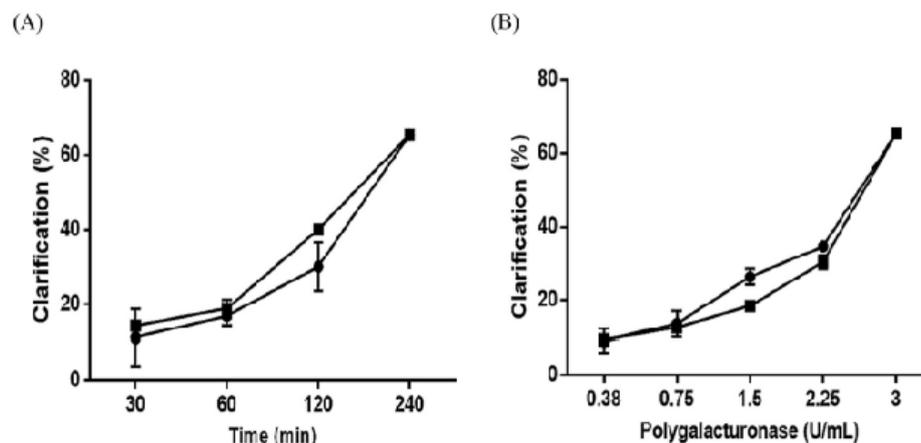


Fig. 4. Clarification of Palmer mango juice by PGAj. (A) Incubation times ranging from 30 min to 240 min were tested at 40 °C (●) and 50 °C (■) using 3 U/mL PGAj; (B) Clarification of Palmer mango juice with PGAj using different enzyme concentrations till 3 U/mL at 40 °C (●) and 50 °C (■).

#### 3.4.2. Process optimization for clarification of Palmer mango juice by PGAj

The optimum incubation time and enzyme concentration required for the clarification of Palmer mango juice (the best clarified pulp by PGAj) using PGAj were evaluated in this study (Fig. 4A). Within 2 h incubation, 30–40% clarification was achieved, reaching 65% after 4 h. A similar study on the treatment of banana juice with purified pectinase from *A. niger* revealed that the highest clarification was achieved when raw banana juice was incubated for 60 min with 2% purified pectinase and the measure of clarification index obtained was 0.10, although the extent of clarification did not significantly differ from that achieved using 30 min treatment (Barman et al., 2015).

Moreover, PGAj loading was varied from 0.38 U/mL to 3 U/mL to test the effect of enzyme concentration on Palmer mango juice clarification, during 4 h at 40 °C and 50 °C (Fig. 4B). The extent of clarification increased proportional to enzyme loading, reaching 65% at the maximum PGAj concentration tested (3 U/mL) (Supplementary Information). Patidar et al. (2020) reported that pomegranate juice treated with increasing concentrations of purified polygalacturonase enzyme (0–80 U) produced by *A. niger* AN07 enhanced the clarification from 6.8% to 24.6% at 30 °C.

Thus, PGAj enzyme in the current study was incubated for 4 h at 40 °C and 50 °C and increased the clarification of Palmer mango (65%), white guava (40%), banana (11%), apple (9.4%), acerola (2.4%), and papaya (1.7%) juices, showing its efficiency for clarification of fruit juices, and its potential for industrial application.

## 4. Conclusion

PGAj was obtained from *A. japonicus* using passion fruit peel as a carbon source, under SSF after 48 h growth. The purified enzyme showed a molecular weight of approximately 40 kDa. The optimal pH, temperature and preferred substrate of PGAj were pH 4.0, 55 °C and citrus pectin, respectively. PGAj also showed good stability in acidic pH. The enzyme showed potential for application in beverage industries for the efficient and economic production of clear fruit juices.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgements

This work was part of Doctoral Thesis of Guimaraes, NCA (Laboratory of Biochemistry and Microorganisms/Federal University of Mato Grosso of Sul, Campo Grande, MS, Brazil). We are grateful for the support of the sector technicians (Carla Leite and Clarice Marchetti), the Multicenter Graduate Program in Biochemistry and Molecular Biology (PMBqBM) and the Federal University of Mato Grosso of Sul. This paper was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.beab.2021.102233>.

## References

- Abdullah, A.L., Sulaiman, N.M., Aroua, M.K., Noor, M.M.M., 2007. Response surface optimization of conditions for clarification of carambola fruit juice using a commercial enzyme. *J. Food Eng.* 81 (1), 65–71.
- Adedeji, O.E., Ezekiel, O.O., 2019. Pretreatment of selected peels for polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* CICC 2040: purification and application in mango juice extraction. *Bioresour. Technology Reports* 7 (August), 100306. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100306>.

- Amin, F., Bhatti, H.N., Bilal, M., Asgher, M., 2017. Purification, kinetic, and thermodynamic characteristics of an exo-polygalacturonase from *Penicillium notatum* with industrial perspective. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 183 (1), 426–443. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2455-y>.
- Amin, F., Bhatti, H.N., Bilal, M., 2019. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—a review. *Int. J. Biol. Macromol.* 122, 1017–1026. <https://doi.org/10.1016/j.jbtomac.2018.09>.
- Anand, G., Yadav, S., Yadav, D., 2017. Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 476 suitable for clarification of orange juice. *3 Biotech* 7, 122. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0760-3>.
- Bamran, S., Sit, N., Badwak, L.S., Deka, S.C., 2015. Pectinase production by *Aspergillus niger* using banana (*Musa balbisiana*) peel as substrate and its effect on clarification of banana juice. *J. Food Sci. Technol.* 52 (6), 3579–3589. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1413-8>.
- Barreto, E.S., 2016. 87 f. Produção, purificação e caracterização de uma poligalacturonase do *Chrysosporium cubensis*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- Bell, J.E., Bell, E.T., 1988. *Proteins Ad Enzymes*. Prentice Hall INC, Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8 (2), 93–99.
- Camargo, L.A., Dentillo, D.B., Cardello, L., Gattás, E.A.L., 2005. Utilization of orange bagasse in pectinases production by *Aspergillus* sp. *Alim. Nutr., Araraquara* 16 (2), 153–156.
- Cerretti, M., Liburdi, K., Benucci, I., Esti, M., 2016. The effect of pectinase and protease treatment on turbidity and on haze active molecules in pomegranate juice. *LWT – Food Science and Technology* 73, 326–333.
- Chamberg, F.S., Valencia, E.Y., 2016. Fungal biodiversity to biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2567–2577.
- Cheng, Z., Chen, D., Wang, Q., Xian, L., Lu, B., Wei, Y., Tang, H., Lu, Z., Zhu, Q., Chen, Y., Huang, R., 2017. Identification of an acidic endo-polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028 and its broad use in major tropical and subtropical fruit juices production. *J. Biosci. Bioeng.* 123 (6), 665–672. <https://doi.org/10.1016/j.jbbsoc.2017.01.013>.
- Cheng, Z., Chen, D., Lu, B., Wei, Y., Xian, L., Li, Y., et al., 2016. A novel acid stable endo polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028: purification, characterization, and application in the beverage industry. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26 (6), 989–998.
- Cologna, N., de, M., de Gómez-Mendoza, D.P., Zanoelo, F.F., Giannesi, G.C., Guimarães, N.C. de A., Moreira, L.F. de S., Filho, E.X.F., Ricart, C.A.O., 2013. Exploring *Trichoderma* and *Aspergillus* secretomes: proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. *Enzym. Microb. Technol.* 109, 1–10. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.08.007>.
- Cruikshank, R.H., Wade, G.C., 1980. Detection of pectic enzymes in pectin-acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 107 (1), 177–181.
- Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. NY Acad. Sci.* 121 (2), 404–427.
- Dal Magro, L., Kordecki, J.F., Klein, M.P., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R., 2019. Stability/activity features of the main enzyme components of rohapect 10L. *Biotechnol. Prog.* <https://doi.org/10.1002/btpr.20377>.
- da Câmara Rocha, J., da Silva Araújo, J., de Paiva, W.K.V., Ribeiro, E.S.S., de Araújo Padilha, C.E., de Assis, C.F., dos Santos, E.S., de Macêdo, G.R., de Sousa Junior, F.C., 2020. Yellow mombin pulp residue valorization for pectinases production by *Aspergillus niger* IOC 4003 and its application in juice clarification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 30, 101876. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101876>.
- de Lucas, R.C., de Oliveira, T.E., Lima, M.S., Pasin, T.M., Searocella, A.S.A., Prada, R.A., Segato, F., Polizeli, M.L., T. M., 2020. Effect of Enzymatic Pretreatment of Sugarcane Bagasse with Recombinant Hemicellulases and Esterase Prior to the Application of the Cellobiohydrolase CBH I Megazyme®. *Biomass Conv. Bioref.* <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00719-9>.
- de Oliveira, R.L., Dias, J.L., da Silva, O.S., Porto, T.S., 2018. Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor. *Food Bioprod. Process.* 109, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.005>.
- Dey, T.B., Adak, S., Bhattacharya, P., Banerjee, R., 2014. Purification of polygalacturonase from *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC 6652 and its application in apple juice clarification. *LWT – Food Sci. Technol.* 59, 591–595.
- Ferreira, F.L., Dall’Antonia, C.B., Shiga, E.A., Alvim, L.J., Pessoni, R.A.B., 2018. Sugarcane bagasse as a source of carbon for enzyme production by filamentous fungi. *HOEHNIA* 45 (1), 134–142. <https://doi.org/10.1590/2236-6906-44/2017>.
- Ferreira, D.F., 2011. *Sisvar: a computer statistical analysis system*. *Cienc. E Agrotecnol* 35, 1039–1042.
- Gani, G., Naik, H.R., Jan, N., Bashir, O., Hussain, S.Z., Rather, A.H., Reshi, M., Amin, T., 2020. Physicochemical and antioxidant properties of pear juice prepared through pectinase enzyme-assisted extraction from William Bartlett variety. *Journal of Food Measurement and Characterization* 15 (1), 743–757. <https://doi.org/10.1007/s11654-020-00676-x>.
- Garzon, C.D., Habrylo, O., Lemaire, A., Guillaume, A., Carré, Y., Millet, C., Foutot-Brun, C., Trezel, P., Le Blond, P., Perrin, A., Georgé, S., Wagner, M., Coutel, Y., Levasseur, L., Pau-Roblot, C., Pelloux, J., 2021. Characterization of a novel strain of *Aspergillus aculeatus*: from rhamnogalacturonan type I pectin degradation to improvement of fruit juice filtration. *Carbohydr. Polym.* 262 (February), <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117943>.
- Global Pectinase Market Research Report, 2017. <https://www.marketresearchstore.com/report/global-pectinase-market-research-report-2017190710>.
- John, J., Kaimal, K.K.S., Smith, M.L., Rahman, F.K.S.M., Chellam, P.V., 2020. Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: a review. *Int. J. Biol. Macromol.* 162, 1035–1099. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2020.06.224>.
- Kaur, A., Richi, V., Soni, S.K., Richi, P., 2020. A novel multi-enzyme preparation produced from *Aspergillus niger* using biodegradable waste: a possible option to combat heterogeneous biofilms. *Amb. Express* 10, 36. <https://doi.org/10.1186/s13660-020-00970-3>.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), 680–685.
- Li, P.J., Xia, J.L., Shan, Y., Nie, Z.Y., 2015. Comparative study of multi-enzyme production from typical agro-industrial residues and ultrasound-assisted extraction of crude enzyme in fermentation with *Aspergillus japonicus* PJ01. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 38, 2013–2022.
- Lowry, H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Raudal, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 267–275.
- Mahesh, M., Arivizhivendhan, K.V., Maharaja, P., Boopathy, R., Hamsavathani, V., Sekaran, G., 2015. Production, purification and immobilization of pectinase from *Aspergillus ibericus* onto functionalized nanoporous activated carbon (FNAC) and its application on treatment of pectin containing wastewater. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 133, 43–54.
- Mahmoodi, M., Najafpour, G.D., Mohammadi, M., 2019. Bioconversion of agroindustrial wastes to pectinases enzyme via solid state fermentation in trays and rotating drum bioreactors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 21, 101280. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101280>.
- Martins, E.D.S., Leite, R.S.R., Da Silva, R., Gomes, E., 2013. Purification and properties of polygalacturonase produced by thermophilic fungus *Thermoascus curanticus* CBMAI-756 on solid-state fermentation. *Enzym. Res.* 1–7, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/438545>.
- Marzo, C., Díaz, A.B., Caco, I., Blaudino, A., 2018. Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. *Waste Manag. Res.* 37 (2), 149–156. <https://doi.org/10.1177/0734242X18793699>.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 (3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Ortiz, G.E., Ponce-Mora, M.C., Nosedá, D.G., Cazabat, G., Saravalli, C., López, M.C., Gil, G.P., Blasco, M., Albertó, E.O., 2016. Pectinase production by *Aspergillus giganteus* in solid-state fermentation: optimization, scale-up, biochemical characterization and its application in olive-oil extraction. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44 (3), 197–211. <https://doi.org/10.1007/s12095-016-1873-0>.
- Pagnonceli, J., Rasbold, L.M., Rocha, G.B., Silva, J.L.C., Kadowaki, M.K., Simão, R.C.G., Maller, A., 2019. Biotechnological potential of an exo-polygalacturonase of the new strain *Penicillium janthinellum* VI2R3M: biochemical characterization and clarification of fruit juices. *J. Appl. Microbiol.* 127 (6), 1706–1715. <https://doi.org/10.1111/jam.14426>.
- Patidar, M.K., Nighojkar, S., Kumar, A., Nighojkar, A., 2020. Production of polygalacturonase using *Carica papaya* peel biowaste and its application for pomegranate juice clarification. *Environ. Sustain.* 3 (4), 509–520. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00133-6>.
- Piccoli-Valle, R.H., Passos, F.M.L., Passos, F.J.V., Silva, D.O., 2001. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. *Braz. J. Microbiol.* 32, 135–140.
- Pedroli, D.B., Monteiro, A.C., Gomes, E., Carmona, E.C., 2009. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *Open Biotechnol. J.* 3 (1), 9–16. <https://doi.org/10.2174/187407070903010009>.
- Rizzatti, A.C.S., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Rechia, C.G.V., Polizeli, M.L.T.M., 2001. Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -D-xylosidase produced

- by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26 (3), 156–160. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.700010>.
- Romine, E., Sainjan, N.C., Silvestar, R., Alidkhanji, A., Varghese, S.A., 2017. Statistical optimisation of xylanase production by estuarine *Streptomyces* sp. and its application in clarification of fruit juice. *J. Genetic Eng. Biotechnol.* 15 (2), 393–401.
- Sandri, I., Silveira, M., 2018. Production and application of pectinases from *Aspergillus niger* obtained in solid state cultivation. *Beverages* 4 (3), 43. <https://doi.org/10.3390/beverages4030043>.
- Sandri, I.G., Fontana, R.C., Silveira, M.M., 2015. Influence of pH and temperature on the production of polygalacturonases by *Aspergillus fumigatus*. *LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft -Technol.)* 61, 430–436.
- Sassi, A.H., Tounsi, H., Trigut-Lahiani, H., Bouzouta, R., Romdhane, Z.B., Gargout, A., 2016. A low-temperature polygalacturonase from *P. occitanus*: characterization and application in juice clarification. *Int. J. Biol. Macromol.* 91, 150–164. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2016.05.07>.
- Semenova, M.V., Grishutin, S.O., Gusakov, A.V., Okunev, O.N., Sinityn, A.P., 2003. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry (Moscow)* 58 (5), 559–569. <https://doi.org/10.1023/A:1023959727067>.
- Silva, P.O., Guimarães, N.C.A., Serpa, J.D.M., Masui, D.C., Marchetti, C.R., Verbisek, N.V., Zanoelo, F.F., Ruller, R., Gianni, G.C., 2019. Application of an endo-xylanase from *Aspergillus japonicus* in the fruit juice clarification and fruit peel waste hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 21, 101312. <https://doi.org/10.1016/j.beab.2019.101312>.
- Silva, J. de C., de França, P.R.L., de Melo, A.H.F., Neves-Petersen, M.T., Converti, A., Souza Porto, T., 2018. Optimized production of *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonases for pectin hydrolysis in hog plum (*Spondias mombin* L.) juice. *Process Biochem.* 79, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.014>.
- Suheimi, N., Ramli, S., Malck, R.A., Aziz, R., Othman, N.Z., Leng, O.M., Esawy, M.A., Gamal, A., El-Enshasy, H., 2016. Optimization of pectinase production by *Aspergillus niger* using orange pectin based medium. *J. Chem. Pharmaceut. Res.* 3 (2), 259–263.
- Tounsi, H., Sassi, A.H., Romdhane, Z.B., Lajnef, M., Dupuy, J.W., Lapallierie, D., Hadj-Taieb, N., 2016. Catalytic properties of a highly thermoactive polygalacturonase from the mesophilic fungus *Penicillium occitanus* and use in juice clarification. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 127, 56–65.
- Vaz, R.P., Vici, A.C., Teixeira de Moraes Polizeli, M.L., Magalhães, P.O., Filho, E.X.F., 2021. Immobilization studies of a pectinase produced by *Aspergillus terreus*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 68 (1), 197–206. <https://doi.org/10.1002/bab.2004>.
- Yuan, P., Meng, K., Huang, H., Shi, P., Luo, H., Yang, P., Yao, B., 2011. A novel acidic and low-temperature-active endo-polygalacturonase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669 with potential for application in apple juice clarification. *Food Chem.* 129 (4), 1369–1375.
- Zohra, M., Syed, M.N., Sohail, M., 2020. Bamara pectin: a promising substrate for the coproduction of pectinase and xylanase from *Aspergillus fumigatus* M616. *Pol. J. Microbiol.* 69 (1), 19–25. <https://doi.org/10.33073/pjm-2020-002>.