

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

NATHALIA NUNES GLIENKE

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
POLIGALACTURONASES DE *Aspergillus niger* M2 E SUA
APLICAÇÃO NA CLARIFICAÇÃO DE SUCOS**

CAMPO GRANDE – MS

2024

NATHALIA NUNES GLIENKE

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
POLIGALACTURONASES DE *Aspergillus niger* M2 E SUA
APLICAÇÃO NA CLARIFICAÇÃO DE SUCOS**

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Giovana Cristina Giannesi

CAMPO GRANDE – MS

MARÇO, 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Glienke, Nathalia Nunes

Purificação e caracterização bioquímica de poligalacturonases de *Aspergillus niger* M2 e sua aplicação na clarificação de sucos – Campo Grande, 2024.

56 f.

Orientadora: Giannesi, Giovana Cristina.

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS. Instituto de Biociências, 2024.

1. Pectinase. 2. Poligalacturonase. 3. *Aspergillus* 4. *Aspergillus niger* 5. Clarificação de sucos.

TERMO DE APROVAÇÃO

NATHALIA NUNES GLIENKE

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
POLIGALACTURONASES DE *Aspergillus niger* M2 E SUA APLICAÇÃO NA
CLARIFICAÇÃO DE SUCOS**

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

22 de março de 2024

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Giovana Cristina Giannesi (Orientadora)
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

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

Prof. Dr. Alexandre Maller
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE)

Esta pesquisa é dedicada aos meus pais, cujo apoio incansável tem sido o pilar fundamental para a realização dos meus sonhos.

A vocês, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Graciela e Gerson Glienke, por todo apoio e sacrifício que vocês dedicaram a mim ao longo da vida. Seu papel fundamental na minha jornada moldou quem sou hoje, e sou eternamente grata por isso. Cada conquista que alcançar será uma expressão da fé que vocês depositaram em mim.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Giovana Cristina Giannesi, expresso minha sincera gratidão por sua amizade, orientação valiosa, paciência incansável, dedicação e por todo café e chocolate pós-almoço.

Aos professores e técnicas do LBq-UFMS, em especial Prof.^a Dr.^a Fabiana Fonseca Zanoelo, Prof. Dr. Douglas Chodi Masui pela instrução e colaboração. Obrigada também a Dr.^a Nelciele Cavalieri de Alencar Guimarães, que me ensinou e ajudou no dia-a-dia no laboratório desde minha iniciação científica.

Aos meus colegas e amigos de laboratório Henrique Covali, João Vitor, Luiza Calastro e Samanta Monção, pela amizade, parceria e pelas incontáveis horas tomando café ao lado do laboratório. Agradeço especialmente Ana Simas e Rodrigo Galeano pelo companheirismo e amizade dentro e fora do laboratório.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão aos meus amigos, que têm sido uma presença constante desde os dias da graduação. Agradeço pelos almoços no meio de semana, pelas valiosas conversas sobre botânica durante a elaboração deste trabalho e também a Caio, cuja ajuda, carinho, conselhos e apoio têm sido fundamentais ao longo de toda minha jornada acadêmica até o presente momento

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e a todos os seus funcionários, alunos e professores pela estrutura acadêmica e pessoal.

Às instituições de fomento, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A aplicação de enzimas nas indústrias tem crescido progressivamente devido à sua eficiência ambiental e adaptabilidade. As pectinases desempenham um papel fundamental na degradação de polissacarídeos da parede celular vegetal, tornando o carbono mais acessível para microrganismos devido à quebra celular. Fungos filamentosos, especialmente do gênero *Aspergillus*, lideram a produção em larga escala dessas enzimas, que são amplamente empregadas na indústria alimentícia, inclusive na clarificação de sucos de frutas. Neste contexto, o objetivo geral foi realizar a purificação de poligalacturonases produzida pelo fungo *Aspergillus niger* M2 e estudar suas características bioquímicas, para então aplicar na clarificação de sucos de fruta. A purificação da poligalacturonase produzida por *Aspergillus niger* M2 foi realizada por dois passos cromatográficos (DEAE-Fractogel e Phenyl-Sepharose), resultando em dois picos P1 e P2. Poligalacturonase do P1 resultou em uma purificação de 27,5 vezes com 51,7% de rendimento e uma atividade específica de 41,2 U/mg de proteína. Já a poligalacturonase do P2 apresentou atividade específica de 150,0 U/mg proteína, resultando em um fator de purificação de 100 vezes e um rendimento de 32,5%. Em termos de condições ótimas de atividade, P1 teve a sua melhor atividade em pH 4,0 e temperatura de 55 °C, enquanto P2 atingiu o seu máximo de atividade em pH 5,0 e temperatura de 50 °C. Além disso, P1 manteve mais de 90% de sua atividade residual após 4 horas em pH 4,0, enquanto P2 manteve 100% de sua atividade residual após 2 horas nos três pH avaliados (3,0, 4,0, 5,0) Ambas as enzimas retiveram mais de 70% de sua atividade residual após 4 horas temperaturas de 50, 55 e 60°C. Para os parâmetros cinéticos, tanto P1 como P2 demonstraram maior afinidade ao ácido poligalacturônico (K_M de 1,93 e 1,62 mg/ml, respectivamente), seguido da pectina cítrica e pectina de maçã. Já para os testes de clarificação de sucos pelas poligalacturonases, foram utilizadas 8 polpas de frutas, onde os melhores resultados foram obtidos pelas polpas de carambola, 270,6% e 248,8% para P1 e P2, respectivamente. Em seguida as polpas de goiaba branca, P1 (183,9%) e P2 (183,1%), e banana-da-terra, chegando a 142,0 e 142,5% para P1 e P2, respectivamente. Assim, pode-se inferir que as poligalacturonases semi-purificadas a partir de *Aspergillus niger* M2 demonstram um grande potencial para serem aplicadas nas indústrias de bebidas, desempenhando um papel fundamental na produção eficiente e econômica de sucos de frutas com maior clareza.

Palavras-chave: poligalacturonases, *Aspergillus niger*, clarificação de sucos.

ABSTRACT

The application of enzymes in industries has been steadily growing due to their environmental efficiency and adaptability. Pectinases, a group of enzymes, play a crucial role in the degradation of plant cell wall polysaccharides, making carbon more accessible to microorganisms due to cell wall breakdown. Filamentous fungi, especially of the genus *Aspergillus*, lead the large-scale production of these enzymes, which are widely employed in the food industry, including in fruit juice clarification. In this context, the overall objective was to purify polygalacturonases produced by the fungus *Aspergillus niger* M2 and study their biochemical characteristics, and then apply them in fruit juice clarification. The purification of polygalacturonase produced by *Aspergillus niger* M2 was carried out through two chromatographic steps (DEAE-Fractogel and Phenyl-Sepharose), resulting in two polygalacturonases, P1 and P2. P1 was purified with a purification factor of 27.5 times, yielding 51.7%, and a specific activity of 41.2 U/mg of protein. P2, on the other hand, had a specific activity of 150.0 U/mg of protein, resulting in a purification factor of 100.0 times with a yield of 32.5%. Regarding the optimal activity conditions, P1 exhibited better activity at pH 4.0 and a temperature of 55 °C, while P2 reached its peak activity at pH 5.0 and a temperature of 50 °C. Furthermore, P1 retained over 90% of its residual activity after 4 hours at pH 4.0, while P2 maintained 100% of its residual activity after 2 hours at the three pH levels evaluated (3.0 – 5.0). Both enzymes retained over 70% of their residual activity after 4 hours at temperatures of 50 °C, 55 °C, and 60 °C. For kinetic parameters, both P1 and P2 showed a higher affinity for polygalacturonic acid (with K_M values of 1.93 and 1.62 mg/ml, respectively), followed by citrus pectin and apple pectin. As for the juice clarification tests using polygalacturonases, eight fruit pulps were used, with the best results obtained for carambola pulp, 270.6% and 248.8% for P1 and P2, respectively. Next were white guava pulps, 183.9% for P1 and 183.1% for P2, and plantain pulp, reaching 142.0% and 142.5% for P1 and P2, respectively. Therefore, it can be inferred that polygalacturonases purified from *Aspergillus niger* M2 demonstrate significant potential for application in the beverage industry, playing a crucial role in the efficient and cost-effective production of fruit juices with greater clarity.

Keywords: polygalacturonase, *Aspergillus niger*, juice clarification.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Biomassa.....	15
2.2 Parede celular	16
2.3 Pectinases	19
2.4 Microrganismos produtores de pectinase	21
2.5 Gênero <i>Aspergillus</i>	23
2.5.1 <i>Aspergillus niger</i>	23
2.6 Aplicações na indústria	24
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Origem e Manutenção do microrganismo	28
4.2 Identificação Molecular.....	28
4.3 Produção da pectinase em fermentação em estado sólido (SSF).....	28
4.4 Ensaio enzimático e proteico	29
4.5 Purificação enzimática.....	29
4.6 Determinação do grau de pureza das poligalacturonases semi-purificadas.....	30
4.6.1. Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	30
4.6.2 Zimograma.....	30
4.7 Caracterização Enzimática.....	31

4.7.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática.....	31
4.7.2 Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da enzima.....	31
4.7.3 Determinação dos parâmetros cinéticos.....	32
4.8 Aplicação das poligalacturonases na clarificação de suco de frutas.....	32
4.9 Análise dos resultados.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Identificação Molecular.....	34
5.2 Purificação enzimática.....	35
5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	36
5.4 Caracterização bioquímica.....	38
5.4.1 Efeito de temperatura e pH na atividade.....	38
5.4.2 Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da enzima.....	40
5.4.3 Parâmetros Cinéticos.....	42
5.5 Aplicação das enzimas na clarificação de suco de frutas.....	44
6. CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Parede celular vegetal.....	16
Figura 2. Representação esquemática das estruturas de pectinas.....	18
Figura 3. Representação esquemática da ação das pectinases.....	20
Figura 4. Árvore filogenética de <i>Aspergillus niger</i> M2	34
Figura 5. Perfil cromatográfico da atividade pectinolítica em coluna DEAE-Fractogel.....	35
Figura 6. Perfil eletroforético da poligalacturonase semi-purificada em SDS-PAGE 12 %.....	37
Figura 7. Efeito do pH na atividade das poligalacturonases semi-purificadas.....	38
Figura 8. Efeito da temperatura na atividade das poligalacturonases semi-purificadas.....	39
Figura 9. Efeito do pH na estabilidade da poligalacturonase semi-purificada.....	40
Figura 10. Efeito da temperatura na estabilidade das enzimas semi-purificada.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Enzimas pectinolíticas e seus substratos.....	21
Tabela 2. Purificação das poligalacturonases de <i>Aspergillus niger</i>	36
Tabela 3. Parâmetros cinéticos da poligalacturonase purificada de <i>Aspergillus niger</i> e comercial.....	43
Tabela 4. Clarificação de sucos de fruta utilizando poligalacturonases (P1 e P2) semi-purificadas e uma pectinase comercial.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA: batata-dextrose-ágar	SSF: fermentação em estado sólido
CM: Carboximetil Celulose	Tris.HCl: Tris.Hydrochloride
DEAE: dietilaminoetil	Tc: transmitância do controle
DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico	Tt: transmitância do teste
FDA: Administração Federal de Alimentos e Medicamento dos Estados Unidos	U: unidade de enzima
GalA: ácido D-galacturônico	U/mg: unidades por miligrama de proteínas
HG: homogalacturonana	UT: unidades totais
P: Fator de Purificação	V_{max} : velocidade máxima da reação
P1: pico 1	K_M : Constante de Michaelis-Menten
P2: pico 2	k_{cat} : número de renovação (<i>turnover</i>)
PAE: pectina acetil esterase	k_{cat}/K_M : eficiência catalítica
PG: poligalacturonase	
PGA: ácido poligalacturônico	
PME: pectina metil esterase	
PMG: polimetilgalacturonases	
PN: Pectato liases	
PPase-A: protopectinase tipo A	
PPase-B: protopectinase tipo B	
PNUMA: Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente	
RG: ramnogalacturonana	
RGI: ramnogalacturonana tipo I	
RGII: ramnogalacturonanas II	
Rcf: força centrífuga relativa	
SDS: Dodecil sulfato de sódio	
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio	

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos destacam-se como excelente fonte de enzimas para aplicações industriais, fomentando o desenvolvimento de tecnologias mais econômicas, graças ao seu baixo consumo de recursos, além de adotarem uma abordagem mais ecológica, caracterizada pela redução nas emissões de carbono e pelo uso responsável dos recursos naturais (Shrestha et al., 2021). Nessa perspectiva, fungos filamentosos desempenham um papel fundamental na produção de enzimas industriais por mais de cinco décadas devido a diversas possibilidades de aplicações, alta especificidade, estabilidade e agilidade no processo (Dalbøge, 1997). Além disso, as enzimas são uma alternativa menos agressiva ao meio ambiente se comparado com opções não biológicas, agindo sob temperaturas e pressões menores, o que também reduz custos. O mercado global de enzimas foi avaliado em US\$ 11,47 bilhões durante 2021 e estima-se que aumente a uma taxa de crescimento anual de 6,5% a partir de 2022 até 2030 (Maghraby et al., 2023).

As pectinases são um grupo de enzimas capazes de degradar a pectina, um polissacarídeo presente na lamela média e parede celular primária de cereais, fibras, frutas e vegetais, levando à desintegração do tecido, causando modificações visualmente perceptíveis durante o amadurecimento de frutas e conseqüentemente facilitando para que outros organismos obtenham o carbono resultante da fragmentação celular (Polizeli et al., 2013). Nesse contexto, muitos microrganismos obtêm nutrientes da decomposição da pectina, o que leva à produção de enzimas capazes de quebrar essa substância, conhecidas como pectinases. Entre os principais produtores dessa enzima, destacam-se os fungos do gênero *Aspergillus*. (Shrestha et al., 2021).

O uso de pectinases é importante para degradação da pectina presente em frutas que geram sucos com alta viscosidade e turbidez, uma vez que estes ainda contêm resíduos de pectina da parede vegetal. No contexto de produção industrial de sucos, pectinases são aplicadas sobretudo na clarificação de sucos, a fim de reduzir a viscosidade da polpa e conseqüentemente sua turbidez, facilitando o processo de filtração e aumentando a qualidade do produto final (Ramadan, 2018). Porém, a fim de aplicar as enzimas na indústria com máxima eficácia, é necessário que estas sejam estáveis atuando em valores de temperatura e pH ótimos (Haile e Ayele, 2022). Portanto, a indústria biotecnológica tem grande interesse em estudos que

investiguem métodos de purificação simples e econômicos, capazes de alcançar elevados índices de purificação e recuperação de enzimas. Testes preliminares realizados no laboratório de bioquímica indicaram que o fungo *Aspergillus niger* produziu pectinases quando crescido em erva-mate como fonte de carbono. Assim, o objetivo do trabalho foi produzir, purificar e caracterizar poligalacturonases *Aspergillus niger* M2 e aplicar nos processos de clarificação de diferentes sucos de frutas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa

Conforme o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), a agricultura desempenha um papel crucial na produção anual de cerca de 5 bilhões de toneladas de biomassa, incluindo resíduos como farelo de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e resíduos de frutas (Wang et al., 2016). A magnitude dessa produção se torna ainda mais evidente quando consideramos o crescimento da população humana, o qual tem gerado uma demanda incessante por alimentos. Nas últimas cinco décadas, a produção agrícola triplicou, uma expansão que se atribui tanto ao avanço tecnológico rumo à revolução verde quanto à expansão das áreas de cultivo (Adejumo e Adebisi, 2021).

No entanto, essa expansão da produção agrícola não está isenta de desafios e implicações. Além de fornecer cerca de 24 milhões de toneladas de alimentos em todo o mundo, o setor agrícola também gera uma quantidade significativa de resíduos orgânicos e subprodutos, muitos dos quais podem ser reaproveitados (Ferdes et al., 2022). Assim, esses resíduos agroindustriais podem apresentar como uma alternativa para o cultivo de fungos e a produção de enzimas, já que a biomassa representa uma fonte de nutrientes (Nigohkar et al., 2019), além de ser uma opção mais econômica (Bharathiraja et al., 2017).

A biomassa consiste em uma matriz complexa de polissacarídeos, tais como celulose, hemicelulose e pectina, além da presença de lignina, bem como quantidades reduzidas de sais minerais e proteínas. A composição da parede celular lignocelulósica das plantas exhibe variações que estão sujeitas a fatores como a espécie vegetal, sua idade, o momento da colheita e as condições e estágios de crescimento envolvidos (Infante, 2020). Dentre os diversos tipos de polissacarídeos que compõem a biomassa vegetal, a pectina se destaca. Ela é encontrada em abundância nos vegetais provenientes dos resíduos resultantes da agroindústria. Essa riqueza de pectina pode ser observada em várias fontes, incluindo a casca de tomate, que pode conter até 83,50% de pectina em sua composição. Além disso, outros exemplos incluem a casca de mamão (49,83%), casca de manga (31,80%) e casca de limão (33,60%) (Chan et al., 2017). Muitos desses resíduos são, por sua vez, subprodutos provenientes da indústria alimentícia.

Esse potencial pouco explorado dos resíduos agroindustriais ressalta a relevância de buscar maneiras sustentáveis e eficazes de aproveitar a pectina presente nesses materiais. Ao fazê-lo, não apenas há a promoção da valorização desses resíduos, mas também há a contribuição para a criação de soluções mais ecológicas e sustentáveis.

2.2 Parede Celular

As frutas são constituídas são constituídas, predominantemente, por tecido parenquimático, que por sua vez é composto por células vegetais. Essas células caracterizam-se pela presença de paredes celulares, cuja estrutura não só determina o tamanho e a forma da célula, mas também influencia a textura do tecido. A parede celular, por sua vez, é segmentada em, pelo menos, três regiões distintas: lamela média, parede primária e parede secundária (Figura 1A). Na parede primária, encontramos principalmente celulose, hemiceluloses, substâncias pécnicas, proteínas (como glicoproteínas e enzimas) e água (Figura 1B). A parede secundária, por outro lado, é mais rígida, apresentando maiores concentrações de celulose, hemiceluloses e lignina, podendo até ser composta por três camadas (S1, S2 e S3). A lamela média é a camada rica em pectina, mantendo juntas as paredes primárias de células adjacentes (Raven et al., 2014; Infante, 2020).

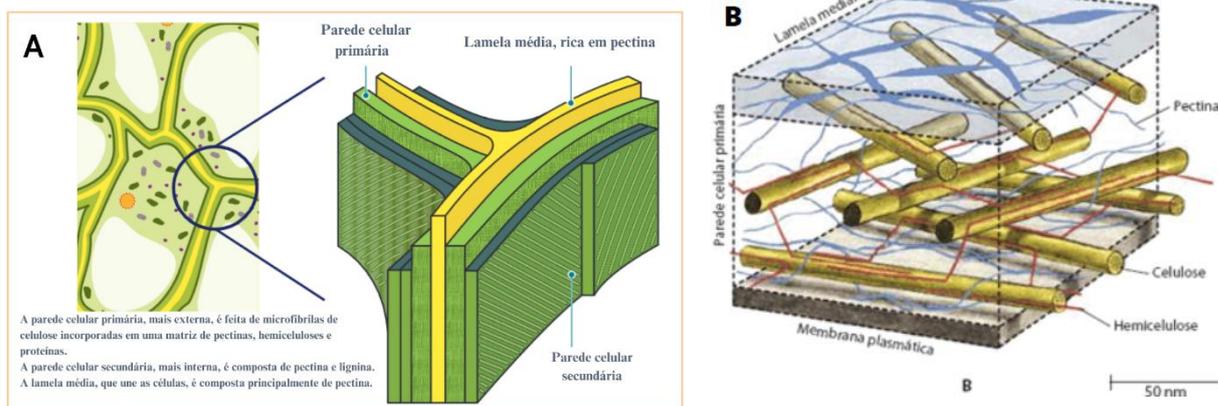


Figura 1. Parede celular vegetal (A) Estrutura geral da parede celular vegetal (Fonte: Adaptado de Madden, 2000). (B) Representação dos componentes da parede celular vegetal (Fonte: Raven et al., 2014).

A pectina é uma das principais responsáveis pela coesão das células vegetais, formando a matriz extracelular que mantém a integridade dos tecidos. Por isso, desempenha um papel central na maturação das frutas, influenciando sua textura, sabor e aroma à medida que a sua estrutura vai sendo alterada por enzimas específicas. Esse processo é essencial para garantir que as frutas alcancem o ponto de consumo ideal (Polizeli et al., 2013).

A primeira descoberta da pectina ocorreu em 1790, quando Vauquelin a identificou no suco de maçã (Vauquelin, 1790). A sua nomenclatura, por sua vez, foi estabelecida por Braconnot em 1825, que derivou o termo do grego "pektikos", associado a congelar ou solidificar (Chan et al., 2017). Presente em tecidos jovens, frutas e vegetais, a pectina exibe um papel crucial na sustentação do tecido vegetal. A sua capacidade de formar um gel não apenas contribui para a adesão celular, mas também desempenha um papel significativo no amolecimento das paredes celulares, facilitando, assim, o alongamento das células (Chan et al., 2017; de Assis et al., 2001). Ao conferir força e suporte, a pectina desempenha um papel fundamental na consistência celular e na resistência mecânica das plantas. No entanto, suas influências não se limitam a esses aspectos. A pectina também exerce influência sobre múltiplas propriedades da parede celular, incluindo a porosidade, carga superficial, pH e equilíbrio iônico. A formação de redes pelas quais ela captura moléculas de soluto facilita o transporte iônico (Harholt et al., 2010; Voragen et al., 2009), ampliando ainda mais o seu papel intrincado e vital no contexto da biologia vegetal. Pectina também é conhecida por ser um agente gelificante, formando gel na presença de íons Ca^{+2} em pH ácido e por isso encontra grande aplicação na indústria alimentícia, especialmente na preparação de compotas e geleias (Karmakar e De, 2019).

Do ponto de vista químico, a pectina revela-se como um heteropolissacarídeo, constituído por uma cadeia central que contém centenas a milhares de resíduos de ácido D-galacturônico (GalA), interligados por meio de uma ligação α -1,4, como pode ser observado na Figura 2. Além disso, apresenta cadeias laterais que incorporam L-ramnose, L-arabinose, D-galactose e D-xilose. A parcela linear da cadeia principal é identificada como homogalacturonana (HG) ou, simplesmente, galacturonana. Essa porção é composta por homopolímeros lineares de resíduos de ácido D-galacturônico, nos quais grupos ácidos estão, em parte ou na totalidade, esterificados com grupos metila, conferindo maior resistência à hidrólise dessa ligação glicosídica (Chan et al., 2017; Infante, 2020).

Já a segunda parcela da cadeia, denominada ramnogalacturonana (RG), divide-se em duas categorias, a saber, ramnogalacturonana I (RG-I) e ramnogalacturonana II (RG-II).

i. A ramnogalacturonana I (RG-I) é composta por uma cadeia principal que pode abranger até 100 unidades repetidas de um dissacarídeo, formado alternadamente por ácido D-galacturônico e ramnose. A inclusão aleatória de ramnose nessa cadeia principal ocasiona uma torção que promove a conexão com cadeias laterais de arabinose e galactose (Chan et al., 2017; Infante, 2020).

ii. A ramnogalacturonana II (RG-II) consiste em um homopolímero, composto por uma cadeia principal com aproximadamente nove ligações de ácido D-galacturônico, associada a quatro cadeias laterais complexas. Estas últimas envolvem 12 monossacarídeos diversos e 20 ligações distintas. Ao contrário de RG-I, RG-II baseia-se em um suporte estrutural de HG, com as cadeias laterais complexas ligadas aos resíduos de GalA (Chan et al., 2017; Infante, 2020).

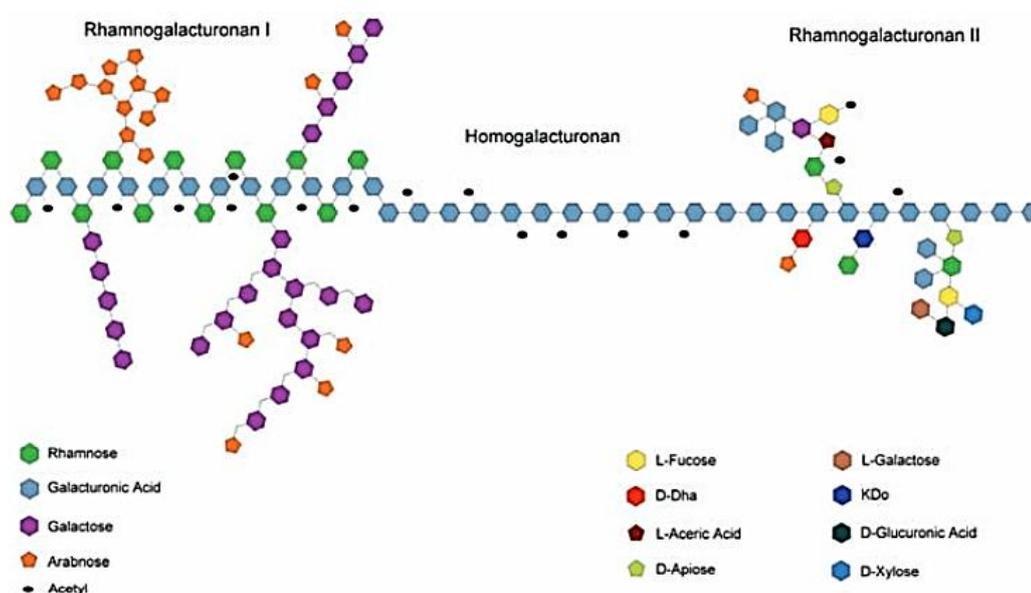


Figura 2. Representação esquemática das estruturas de pectinas (Polizeli et al., 2013)

A intrincada estrutura da pectina propicia uma ampla diversidade de configurações na natureza, cada qual recebendo uma classificação única. Dentro dessa gama, as pectinas se dividem em protopectinas, ácido pécico, ácido pectínico e pectina propriamente dita (Kashyap

et al., 2001). As protopectinas, presentes em tecidos de plantas intactos e insolúveis em água (Polizeli et al., 2013), exercem o papel de "cola" entre as paredes celulares de células vegetais distintas em frutos verdes. No processo de amadurecimento, essas protopectinas são convertidas em pectina por um conjunto de enzimas denominadas pectinases (Infante, 2020).

Ácidos pécticos, são solúveis em água e contém quantidades modestas de grupos metoxil, enquanto os ácidos pectínicos, que têm a habilidade de formar gel quando em meio a concentrações elevadas de açúcares e baixo pH. Esses últimos são comuns em preparações como geleias e doces de frutas (Yamashita, 2017). Já às pectinas, conferem estrutura, firmeza e capacidade de resistência à compressão aos tecidos vegetais (Santi et al., 2014).

Dado que a pectina é um composto complexo e essencial nas estruturas vegetais, seu manejo exige métodos altamente especializados. Nesse contexto, entram em cena as enzimas, especialmente as pectinases, que se destacam como ferramentas indispensáveis para decifrar a complexa matriz de ligações que compõem a pectina.

2.3 Pectinases

As pectinases formam um grupo distinto de enzimas que possuem a capacidade de catalisar a degradação dos polímeros de pectina encontrados na parede celular das plantas. Essas enzimas são classificadas de acordo com seu mecanismo de ação na cadeia principal, atuando predominantemente na despolimerização (hidrolases e liases), na desesterificação (esterases) ou na conversão da protopectina em pectina (protopectinases) (Guimarães, 2023; Infante, 2020).

As enzimas responsáveis pela despolimerização atuam ao romper a ligação glicosídica α -1,4 entre as moléculas de ácido galacturônico. Esse processo pode ocorrer por hidrólise, feita por hidrolases como poligalacturonases (PG) ou polimetilgalacturonases (PMG), ou por trans-eliminação, mediada por liases como as pectato liases (PN) (Kavuthodi e Sebastian, 2018), como mostra a Figura 3. A classificação dessas enzimas também depende de sua seletividade para hidrólise ou trans-eliminação, voltadas para pectina, ácido péctico ou oligogalacturonato como substratos. Além disso, a ação das enzimas pode ser aleatória (endo-) ou terminal (exo-), contribuindo para diferentes padrões de degradação, como mostra a Tabela 1. (Kavuthodi e Sebastian, 2018; Kohli e Gupta, 2015).

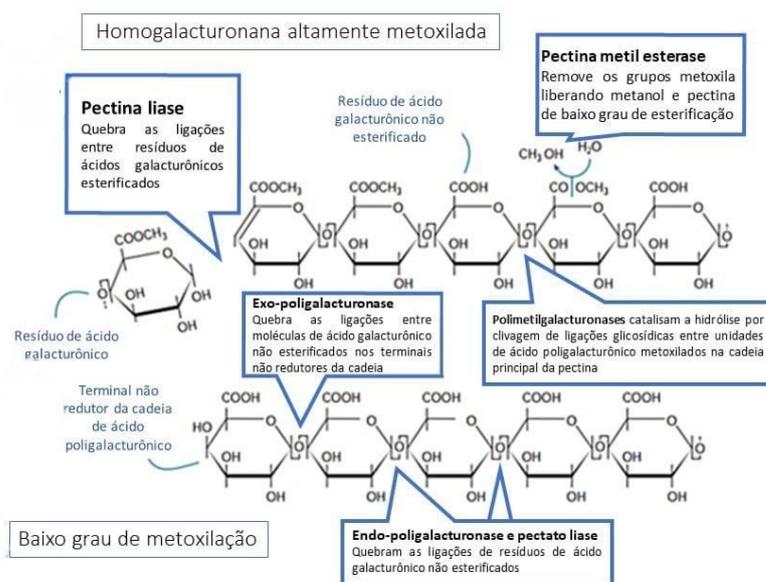


Figura 3. Representação esquemática da ação das pectinases (Adaptado de Poletto et al., 2015)

As pectinases voltadas à desesterificação da pectina são denominadas esterases, operando por meio da hidrólise das ligações éster presentes na estrutura da pectina. Este conjunto engloba dois tipos distintos de enzimas: a pectina metil esterase (PME) e a pectina acetil esterase (PAE). A atuação das esterases desempenha um papel fundamental no processo de degradação completa da pectina, uma vez que as hidrolases e liases requerem substratos sem grupos esterificados para exercerem sua ação de maneira efetiva (Kavuthodi e Sebastian, 2018).

As protopectinases (PPases), por outro lado, são enzimas com a capacidade de degradar protopectinas insolúveis em água, promovendo a quebra das ligações de GalA com outros polissacarídeos presentes na parede celular, resultando na formação de pectina solúvel altamente polimerizada. São classificadas em PPases de tipo A e B, dependendo de onde na estrutura da pectina a enzima irá agir. Protopectinases de tipo A reagem com a região interna da cadeia de GalA, enquanto as protopectinases de tipo B agem na extremidades do polissacarídeo, ou seja, com as cadeias de polissacarídeos que podem estar conectadas às cadeias de ácido poligalacturônico (Guimarães, 2023).

Tabela 1. Enzimas pectinolíticas e seus substratos

Classificação	Nome	Substrato
Protopectinases	Protopectinases tipo A	Protopectina
	Protopectinases tipo B	Protopectina
Hidrolases	Endo-polimetilgalacturonases	Pectina
	Exo-polimetilgalacturonases	Pectina
	Endo-poligalacturonases	Ácido péctico
	Exo-poligalacturonases	Ácido péctico
Liases	Endo-pectina liases	Pectina
	Endo-pectato liases	Ácido péctico
	Exo-pectato liases	Ácido péctico
Esterases	Pectina metil esterases	Pectina
	Pectina acetil esterases	Pectina

Fonte: (Guimarães, 2023)

O conjunto dessas enzimas decompõe a pectina presente na lamela média, levando à desintegração do tecido, que pode ser utilizada como fonte de carbono ou sofrer modificações durante a maturação do fruto. Esse processo de desintegração do tecido através da degradação da pectina da lamela média é conhecido como maceração celular. Como resultado, pectinases são produzidas por várias formas de vida, principalmente plantas, para auxiliar na maturação de frutos, e por microrganismos que utilizam essas plantas como fonte de nutrientes (Polizeli et al., 2013). Pectinases, são produzidas tanto por organismos procarióticos, que sintetizam especialmente pectinases alcalinas, ou por eucarióticos, especialmente fungos, que sintetizam pectinases ácidas (Hoondal et al., 2002; Kashayp et al., 2001).

2.4 Microrganismos produtores de pectinases

Os microrganismos destacam-se como excelentes produtores de enzimas com aplicações em diferentes setores da indústria, possibilitando o desenvolvimento de tecnologias mais econômicas devido ao baixo consumo de recursos, além de serem uma abordagem mais ecológica, caracterizada pela redução nas emissões de carbono (Kohli and Gupta, 2015).

Pesquisas revelam que aproximadamente 35% da produção total de pectinases tem origem em bactérias e 55% por fungos e leveduras (Shrestha et al., 2021). Dentre os principais gêneros bacterianos utilizados para a síntese dessas enzimas, destacam-se *Bacillus* e *Pseudomonas* (Hoondal et al., 2002). Bactérias tendem a produzir pectinases funcionais em níveis de pH mais elevados, o que possibilita sua aplicação em processos alcalinos, como no processamento têxtil e biodecapagem de fibras de algodão (Anand et al., 2017). Por exemplo, pectinases derivadas de *Bacillus tequilensis* demonstraram notável estabilidade, apresentando níveis maiores de atividade em um ambiente com pH 10,0. Da mesma forma, como observado por Shrestha e colaboradores (2021), a pectina liase proveniente de *Paenibacillus xylanolyticus* exibiu estabilidade em pH 9,0 (Shrestha et al., 2021).

Mais da metade da produção total de pectinases é proveniente de fungos e leveduras. (Kavuthodi e Sebastian, 2018). Fungos filamentosos têm desempenhado um papel fundamental na produção de enzimas industriais por mais de cinco décadas (Dalbøge, 1997), sendo reconhecidos como excelentes produtores de pectinases e frequentemente empregados na fermentação em estado sólido (SSF) para uma produção mais econômica (Kavuthodi e Sebastian, 2018). Devido à sua facilidade de propagação e capacidade de adaptação a diferentes ambientes e substratos, os microrganismos encontram-se bem posicionados para utilizar resíduos vegetais como substratos durante os ciclos de cultivo (Guimarães, 2023). Um exemplo notável é a erva de tereré, amplamente consumida e descartada no Brasil (Sant'Ana et al., 2016). Esses resíduos possuem um potencial significativo para serem empregados como substratos na produção de enzimas pelos microrganismos.

Diversas espécies de fungos têm sido empregadas na produção de pectinases, incluindo *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium* sp., *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma* sp., *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. awamori*, *A. sojae* e *A. foetidus* (Ramadan, 2018; Ruiz et al., 2016).

A principal aplicação destas pectinases produzida por microrganismos está na indústria alimentícia, onde são utilizadas na preparação de sucos, vinhos, fermentação de chá e café. Nesta indústria, a cepa mais frequentemente utilizada na produção de pectinases pertence ao gênero *Aspergillus*. Esta escolha é de significativa importância, uma vez que essa cepa é conhecida por sintetizar metabólitos não tóxicos de relevância econômica (John et al., 2020; Shrestha et al., 2021). Adicionalmente, o uso de *Aspergillus* sp. como microrganismo produtor

é amplamente reconhecido por sua segurança. Conforme a Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos Estados Unidos, tanto *Aspergillus niger* quanto *Aspergillus oryzae* são classificados como espécies seguras para aplicação na indústria alimentícia (Haile e Ayele, 2022).

2.5 Gênero *Aspergillus*

Aspergillus, um dos gêneros mais antigos de fungos e é extremamente diversificado e amplamente distribuído de fungos ascomicetes filamentosos, compreendendo mais de 200 espécies, em sua maioria assexuadas. Crescem abundantemente como saprófitas em vegetação em decomposição, tendo sido encontrados no feno, pilhas de composto orgânico, folhagem e semelhantes (Gugnani, 2003). A maioria das espécies está adaptada à degradação de polímeros vegetais complexos, mas também podem alimentar-se de substratos tão diversos como o estrume e até tecidos humanos (Goldman and Osmani, 2008).

Além disso, os fungos deste gênero desempenham papéis fundamentais em diversos processos industriais, incluindo a produção de enzimas (como amilases e xilanases), a síntese de produtos químicos essenciais (ácido cítrico) e a fabricação de alimentos. Inúmeras espécies de *Aspergillus* são reconhecidas por sua capacidade de produzir metabólitos de interesse industrial, destacando-se entre elas o *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sojae* (Goldman and Osmani, 2008). No entanto, uma das espécies mais estudadas e utilizadas na indústria é o *Aspergillus niger*.

2.5.1 *Aspergillus niger*

Em 1917, o químico de alimentos James Currie foi o primeiro a descrever as propriedades do *Aspergillus niger* na produção de ácido cítrico, um importante antioxidante, conservante, acidulante, regulador de pH e aromatizante em alimentos e bebidas (Behera, 2020). Embora essa aplicação seja amplamente conhecida há mais de 100 anos, as suas utilizações industriais se expandem para além disso, incluindo a produção de enzimas e outras moléculas relevantes. Com o avanço tecnológico e a adoção de técnicas de cromatografia, diversas enzimas de *A. niger* foram purificadas e estudadas, como oxidases, desidrogenases,

hidrolases, celulasas e pectinases. Essas descobertas não apenas foram úteis para a produção industrial de enzimas, mas também contribuíram significativamente para a compreensão da função enzimática (Cairns et al., 2018).

Além disso, *A. niger* também tem sido empregado na fabricação de coquetéis enzimáticos para degradar polissacarídeos vegetais, com a produção de celulasas, hemicelulasas e pectinases, capazes de decompor a matéria vegetal. Estima-se que esta espécie de *Aspergillus* possua mais de 170 genes codificantes relacionados à degradação de biomassa vegetal, tornando-se um recurso valioso e versátil para a indústria bioquímica e biotecnológica, com potencial significativo para desenvolver soluções inovadoras na produção de biocombustíveis, alimentos e produtos sustentáveis (Cairns et al., 2018).

Dessa forma, torna-se evidente uma ampla variedade de aplicações para os fungos do gênero *Aspergillus* em várias indústrias, destacando-se especialmente o *A. niger*, uma espécie já amplamente estabelecida e estudada.

2.6 Aplicações na indústria

A aplicação de enzimas, como celulasas, xilanases e pectinases, em diversos setores da indústria, tem experimentado um crescimento contínuo. Esse aumento é atribuído à ampla gama de possibilidades de utilização, bem como à alta especificidade, estabilidade e eficiência que essas enzimas trazem aos processos industriais (Haile & Ayele, 2022). Além dessas vantagens, as enzimas apresentam-se também como uma alternativa menos agressiva ao meio ambiente, se comparadas a opções não biológicas, além de agir em temperaturas e pressões menores, reduzindo também custos, configurando a chamada biotecnologia branca (Cologna et al., 2018; Shrestha et al., 2021).

O primeiro uso comercial de uma pectinase foi registrado em 1930. Atualmente, o mercado global de pectinase tem projeções de atingir até 450,3 milhões de dólares em 2028 (Global Pectinase Market Research Report, 2023). É relevante destacar que a produção e comercialização de pectinases ocupam aproximadamente 10% do mercado global de enzimas em geral (Berger, 2014), e representam significativos 25% do mercado de enzimas na esfera da indústria de alimentos e bebidas (Amin et al., 2022).

Pectinases podem ter inúmeras aplicações na indústria, como indústrias de papel e celulose, tratamento de águas residuais, produção de bioetanol, extração de DNA e isolamento de protoplastos de uma planta, na preparação de ração animal, sacarificação e liquefação de biomassa, maceração e degomagem de fibra vegetal, bio lavagem de fibra de algodão, fermentação de café e chá (Shrestha et al., 2021). Mas sua principal aplicação está na indústria alimentícia, sendo especialmente usadas na produção de vinhos e sucos (De Souza e Kawaguti, 2021).

As pectinases têm amplo uso no processo de produção de vinho. São adicionadas à polpa antes e após a fermentação, além de serem aplicadas para a sedimentação de partículas durante a fermentação. A adição dessas enzimas resulta em vinhos mais límpidos, com melhorias nas características, como quantidade de compostos fenólicos, cor e aroma (Nighojkar et al., 2019; Zavala-Páramo et al., 2021). Já na sua principal aplicação comercial, na indústria de sucos, esta enzima é utilizada na clarificação de sucos, onde pode ser combinada com outras enzimas, a fim de reduzir a viscosidade da polpa e conseqüentemente sua turbidez, além de facilitar o processo de filtração (Ramadan, 2018). Devido à presença de pectina, os sucos de frutas exibem naturalmente características de turbidez e viscosidade. Essas características apresentam desafios tanto nos processos industriais quanto no valor comercial do produto final, uma vez que sucos mais límpidos possuem um maior apelo junto aos consumidores (Haile e Ayele, 2022). Isso ocorre devido a uma interação durante os processos industriais: a pectina, com sua carga negativa, pode revestir moléculas de proteínas carregadas positivamente. Esse revestimento resulta na formação de partículas suspensas que conferem ao suco sua aparência gelatinosa, viscosa e turva, além de propiciar o crescimento de microrganismos, diminuindo a qualidade e validade do suco (Karmakar e De, 2019).

Portanto, a adição de pectinases após o processo de maceração desencadearia a degradação da pectina (despectinização), expondo as proteínas carregadas positivamente. A exposição dessas proteínas carregadas positivamente reduz a repulsão eletrostática entre as partículas da suspensão, levando à formação de partículas mais densas, que irão decantar. Esse processo adicional de estabilização resulta em uma partícula mais volumosa, contribuindo para a obtenção de um suco mais límpido (Tapre e Jain, 2014). Adicionalmente, as pectinases têm o efeito de diminuir a capacidade de retenção de água da pectina, o que resulta na redução da viscosidade e turbidez do suco. Por isso, o tratamento enzimático promove a clarificação do

suco ao desdobrar a pectina, auxiliando na sedimentação das partículas em suspensão e eliminando alterações indesejáveis de cor, aroma e estabilidade (Nighojkar et al., 2019; Shrestha et al., 2021; Tapre e Jain, 2014).

Com isso, diversas pectinases são aplicadas na clarificação de diversos sucos de interesse comercial, como suco de maçã usando enzimas produzidas pelo gênero *Aspergillus* (Joshi et al., 2011), chegando a uma redução de até 90% da turbidez com pectinases de *Aspergillus niger* (Kant et al., 2013a; Sandri et al., 2013). Sucos de manga (Kumar et al., 2012) e algumas frutas cítricas, como laranja e limão também obtiveram bons resultados com a aplicação de pectinase produzida por *Aspergillus foetidus*. Diaz et al. (2013) relataram uma clarificação de cerca de 95% em suco de laranja por uma combinação de poligalacturonase e xilanase de *Aspergillus awamori*. Outros estudos também identificaram a eficácia de microrganismos na clarificação de sucos de diferentes frutas. Por exemplo, pectinases de *Aspergillus tubingensis* foram apontadas como responsáveis pela clarificação de suco de abacaxi (Patidar et al., 2016). Além disso, pectinases produzidas tanto por *A. niger* (Tochi et al., 2009) quanto por *Penicillium occitanis* demonstraram capacidade de reduzir cerca de 77% da viscosidade e 47% da turbidez em sucos de limão (Maktouf et al., 2014). Portanto, é possível verificar uma grande variedade de aplicações das poligalacturonases na clarificação de diversos sucos.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Purificar e caracterizar as poligalacturonases de *Aspergillus niger* M2 e sua aplicação nos processos de clarificação de suco de frutas.

3.2 Objetivos específicos:

- i. Produção das pectinases de *Aspergillus niger* M2 usando a erva de tereré como fonte de carbono;
- ii. Identificação molecular e filogenética;
- iii. Purificação das poligalacturonases através de colunas cromatográficas;
- iv. Caracterização bioquímica das poligalacturonases, quanto ao pH e temperatura, estabilidade térmica e ao pH, cinética enzimática (K_M , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_M);
- v. Aplicação das enzimas nos processos de clarificação de sucos de frutas cítrica comparando com a enzima comercial;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem e Manutenção do microrganismo

Foi selecionado o fungo filamentososo *Aspergillus niger* M2 (Genbank: PP263611) para este trabalho, sendo a identificação morfológica realizada pela técnica Clarice Rossato Marchetti da Micoteca da UFMS de Campo Grande/MS e a molecular pela GoGenetic, conforme descrito no item 4.2. A manutenção do fungo ocorreu por meio de repiques periódicos a cada 30 dias em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) inclinado mantido em estufa a 35°C durante 5-7 dias. Depois foi armazenado em geladeira e usados no momento do experimento.

4.2 Identificação Molecular

A extração do DNA do microrganismo foi conduzida conforme a metodologia descrita por Tel-Zur et al. (1999). As amostras de DNA genômico foram encaminhadas para GoGenetic para sequenciamento da região ITS, conforme protocolo estabelecido por White et al. (1990), utilizando os primers ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3).

As sequências da região ITS foram analisadas e alinhadas utilizando o software BioEdit 7.0.5.4 e editadas manualmente. A identificação taxonômica foi realizada por meio do BlastN disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI). A construção da árvore filogenética foi executada utilizando o método de Neighbor-Joining (NJ) com 1000 réplicas (Bootstrap). As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando o modelo Kimura 2-parâmetros, empregando o software MEGA 6.0.

4.3 Produção da pectinase em fermentação em estado sólido (SSF)

Para a produção das pectinases em estado sólido, os esporos de *Aspergillus niger* M2 foram ressuspensos em 10 ml de solução de sais contendo (NH₄)₂SO₄ (0,1%) e MgSO₄.7H₂O

(0,1%), e colocados em Erlenmeyers de 250 ml contendo 5 gramas de erva de tereré (*Ilex paraguariensis*) usada como fonte de carbono. Para a produção das enzimas, o meio sólido foi colocado em estufa a 35°C durante 72 horas. Após o crescimento em estado sólido, as culturas foram incubadas com 50 ml de água destilada, agitadas durante 30 minutos à aproximadamente 4°C e 100 rpm em um agitador e filtradas usando bomba a vácuo, kitassato e funil de Buchner com papel filtro e foram dialisadas contra água a 4°C durante 24 horas. O filtrado dialisado obtido foi considerado como extrato bruto contendo as enzimas, usado nos ensaios posteriores.

4.4 Ensaio enzimático e proteico

A atividade da poligalacturonase foi determinada por meio da incubação da enzima em tampão McIlvaine pH 4,0 (McIlvaine, 1921) com 1% de pectina cítrica a 60°C. Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 0, 15 e 30 minutos, interrompendo a reação com ácido 3,5- ácido dinitrosalicílico (DNS), conforme a metodologia de Miller (1959). Uma unidade de enzima (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mol de ácido galacturônico por minuto, nas condições do ensaio. A dosagem de proteínas foi realizada segundo o método de Lowry et al. (1951), usando soroalbumina bovina como padrão. A atividade específica foi determinada usando unidades por miligrama de proteína (U/mg).

4.5 Purificação enzimática

As enzimas foram semi-purificadas aplicando o extrato bruto dialisado (50 ml) na coluna DEAE-fractogel (2,0 x 11,0 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0. As proteínas retidas foram eluídas em gradiente de 0 a 1 M de NaCl, usando o mesmo tampão. Frações de 3 ml com atividade enzimática foram coletadas automaticamente, reunidas e dialisadas.

Em seguida, a amostra do pico 2 obtida em DEAE foi equilibrada com tampão Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0, contendo 1M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e o volume total de 550 ml foi submetido à cromatografia em coluna Phenyl-sepharose CL-4B (2,0 x 8,5 cm). As proteínas foram então eluídas com este mesmo tampão em um gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1-0 M). As amostras coletadas foram separadas em dois picos, sendo as proteínas coletadas antes do gradiente denominadas

de pico 1 (P1) e após o gradiente denominado de pico 2 (P2). Posteriormente ambos os picos foram dialisados separadamente e as enzimas caracterizadas bioquimicamente.

4.6 Determinação do grau de pureza das enzimas semi-purificadas (P1 e P2)

4.6.1. Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Para verificar a homogeneidade das poligalacturonases semi-purificadas foi realizada a eletroforese em condições desnaturantes em gel de poliacrilamida segundo o método de Laemmli et al. (1970) com modificações. O gel de estoque foi feito na concentração de 4 % e o gel de corrida a 12 %. Uma quantidade de 50 µg das enzimas foram aplicadas em 20 µL de tampão de corrida contendo tampão Tris 0,05 M, pH 8,3/glicina 0,384 M, 2 µL de glicerol e 2 µL de azul de bromofenol 0,1%, sendo o volume total aplicado no gel. Como modificações do método original, não foram aplicadas na amostra SDS 1% e β-mercaptaetanol e as amostras não foram submetidas a fervura.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em tampão Tris 0,05 M, pH 8,3/glicina 0,384 M, diluído 5 vezes. Após a aplicação, a tensão elétrica foi fixada em 110 V sendo os géis feitos em placas de 1,5 mm do Sistema de gel Mini-PROTEAN da Bio-Rad. Os marcadores de massa molecular utilizados foram da BioRad 1610363, sendo uma mistura de 10 proteínas altamente purificadas, com suas massas moleculares pré-definidas.

Após a corrida, as proteínas presentes nos géis foram reveladas por meio de nitrato de prata com o uso do ProteoSilver™ Silver Stain Kit (Sigma Aldrich).

4.6.2 Zimograma

Uma concentração de 50µg da enzima foi submetida a uma eletroforese em gel SDS - PAGE (12%) (v/v), como descrito no item 4.6.1.

Após a corrida da eletroforese, como descrito no item anterior, o gel foi incubado em solução de Triton X-100 (2,5%) (v/v) por 30 minutos, sob agitação, em temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi incubado em tampão McIlvaine pH 5,0 com pectina cítrica 1%, a 45 °C por 120 minutos. Posteriormente, o gel foi lavado com água deionizada e imerso em solução

vermelho de rutênio (0,02%) (m/v) sob agitação por 30 minutos. Por fim, o gel foi descorado com água destilada até o aparecimento das bandas.

4.7 Caracterização Enzimática

4.7.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática

O pH ótimo das enzimas (P1 e P2) foi determinado a 50°C, incubando 500 µL da enzima em 100 µL tampão Glicina 100 mM pH 2,0, tampão McIlvaine pH 3,0-8,0 e 500 µL de água com pectina cítrica 1% como substrato.

A temperatura ótima das enzimas fora determinada incubando 500 µL da enzima em 500 µL no seu pH ótimo de atividade contendo pectina cítrica 1% em uma faixa de temperatura variando de 40°C a 70°C. As atividades residuais foram calculadas como uma percentagem da atividade máxima.

4.7.2 Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da enzima

A fim de avaliar como o pH afeta a estabilidade da enzima, 3,6 mL da enzima foram misturados com 700 µL de tampão McIlvaine em pH 3,0, 4,0 e 5,0. A seguir, essa mistura foi pré-incubada no gelo por até 240 minutos. Alíquotas de 500 µL foram retiradas em intervalos de 20, 40, 60, 120 e 240 minutos e o ensaio enzimático foi realizado conforme o item 4.4.

Para investigar adicionalmente a influência da temperatura na estabilidade enzimática, a poligalacturonase foi submetida a incubação em tampão McIlvaine com pH 5,0, a temperaturas de 50, 55 e 60°C, por um período de até 240 minutos. Alíquotas de 500 µL foram coletadas em intervalos de 20, 40, 60, 120 e 240 minutos, seguidas da realização do ensaio enzimático (item 4.4). A atividade foi expressa como atividade residual, sendo que o valor de 100 % de atividade correspondeu à atividade realizada em pH e temperatura ótima da enzima.

4.7.3 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos (K_M , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_M) das poligalacturonases semi-purificadas (P1 e P2) e da comercial foram determinados para três substratos diferentes: pectina cítrica (Sigma P9135), pectina de maçã (Sigma P93854) e ácido poligalacturônico (Sigma P3888) com concentrações variando de 0,5 até 10 mg/ml. Os dados foram analisados com o software SigrafW (Leone et al., 2005).

4.8 Aplicação das poligalacturonases na clarificação de suco de frutas

Para este teste, a metodologia usada foi de acordo com Rosmine et al. (2017) e Guimarães et al. (2022). Foram utilizadas as enzimas provenientes do pico 1 (P1) e pico 2 (P2) da purificação a partir do *Aspergillus niger* M2 e a enzima comercial (Pectinex), para fins de comparação. Todas as enzimas foram ajustadas para 0,2 U/ml.

Para a clarificação foram utilizadas polpas de diferentes frutas, sendo elas: banana-da-terra, carambola, cupuaçu, goiaba branca, maçã argentina, manga Haden, manga Palmer e manga Tommy. As frutas foram descascadas e liquidificadas usando um liquidificador, obtendo as polpas das frutas. As polpas foram misturadas com o extrato enzimático na proporção de 1:1, 2 ml de extrato enzimático para 2 ml de polpa, e incubadas a 40°C durante 4 horas em agitação (140 rpm). Ao fim do período de incubação, todas as polpas contendo a enzima foram fervidas durante 5 minutos a fim de interromper toda atividade enzimática. Em seguida foram centrifugadas a 16.873 rcf durante 15 minutos e o sobrenadante usado para medir a transmitância a 650 nm em espectrofotômetro tomando água destilada como o branco. A polpa de cada fruta com água destilada na proporção 1:1 foram utilizadas como controle.

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) como descrito por Rosmine et al. (2017).

4.9 Análise dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em duplicata seguindo as metodologias pré-estabelecidas e os valores obtidos foram expressos como média e seu desvio padrão. As médias do teste de clarificação foram comparadas pelo teste post hoc de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas em $p < 0,05$. Os softwares utilizados foram o Sisvar 5.8 (Ferreira, 2011) e o GraphPad Prism versão 8 (San Diego, California, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação molecular

A análise das sequências ITS1 e ITS4 foi realizada por meio do BlastN, disponibilizado pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI), e os resultados foram confrontados com as sequências do banco de dados GenBank, com o propósito de identificar o fungo em questão. A análise genômica identificou o microrganismo como uma cepa de *Aspergillus niger*, com 99,66% de similaridade com a cepa de *A. niger* RMUAN75, e 99,65% com a cepa de referência *A. niger* ATCC 16888, como demonstra a Figura 4. O número de acesso obtido no GenBank foi PP263611.

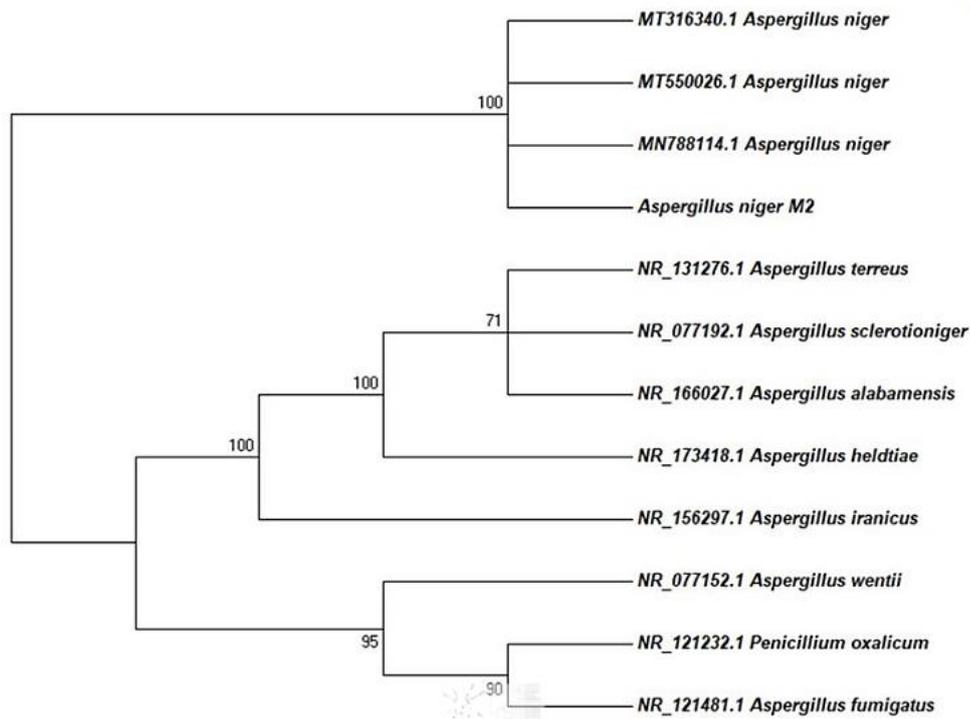


Figura 4. Árvore filogenética de *Aspergillus niger* M2. A árvore filogenética foi construída utilizando o método Neighbor-Joining com base nas sequências da região ITS dos isolados de *Aspergillus niger*. Os valores em cada ponto dos ramos da árvore representam o suporte bootstrap calculado a partir de 1.000 réplicas, indicando a confiabilidade do padrão de ramificação na árvore.

5.2 Purificação enzimática

Neste tópico, será descrita a semi-purificação de um extrato bruto obtido a partir do crescimento do fungo *Aspergillus niger* M2 em SSF utilizando a erva tereré como fonte de carbono por um período de 72 horas. O extrato bruto dialisado, volume de 50 mL, foi equilibrado em tampão Tris HCl 500 mM pH 8,0 e aplicado na coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Fractogel, onde se observou a atividade das poligalacturonases após aplicação de um gradiente de NaCl (0-1M), conforme apresentado na Figura 5. Os tubos contendo a atividade de poligalacturonase (de 95 a 165) foram reunidos e dialisados, totalizando um volume de 246 mL.

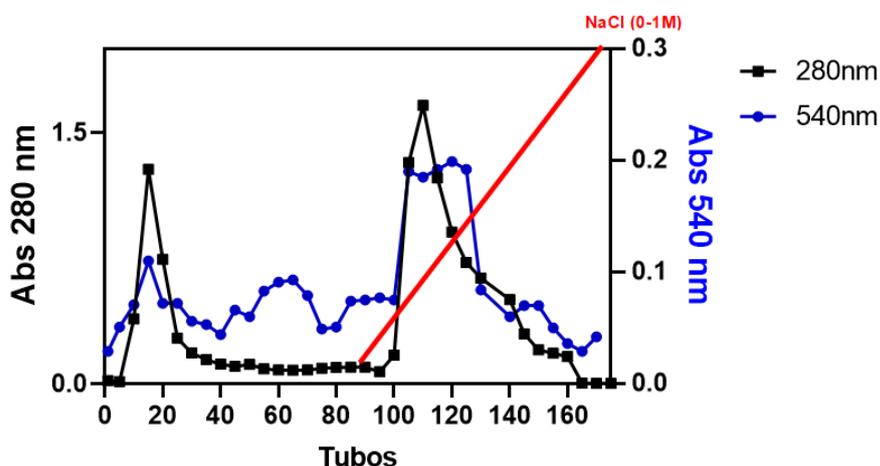


Figura 5. Perfil cromatográfico da atividade pectinolítica em coluna DEAE-Fractogel. Frações de 3 mL foram coletadas por tubo. Proteína (■) e atividade enzimática (●).

Em seguida, aplicou-se a amostra em coluna de Phenyl- Sepharose previamente equilibrada em tampão Tris-HCl, 10 mM, pH 8,0 contendo 1M de sulfato de amônio. Foi identificada atividade das poligalacturonases antes (P1) e após a aplicação do gradiente de sulfato de amônio (1-0 M) (P2), logo os tubos de cada um dos picos foram reunidos e dialisados separadamente. Após a diálise, P1 obteve um volume de 550 ml e apresentou 41,9 U/mg de atividade específica, um rendimento de 51,7% e fator de purificação de 28,5 vezes. Já o P2, com volume de 160 ml, obteve atividade específica de 150,7 U/mg, rendimento de 32,5% e fator de purificação de 102,4 vezes (Tabela 2).

Tabela 2. Purificação das poligalacturonases de *Aspergillus niger* M2

	Volume (ml)	Atividade Enzimática (U/Totais)	Proteínas Totais (mg)	AE (U/mg)	%	P
Extrato Bruto	50	74,3	50,5	1,5	100	1
DEAE – Fractogel	246	68,9	14,7	4,7	92,5	3,1
Phenyl – Sepharose P1	550	38,5	0,9	41,2	51,7	27,5
Phenyl – Sepharose P2	160	24,0	0,2	150,0	32,2	100,0

Atividade Específica (U/mg); Rendimento= %; P= Fator de purificação

Várias pectinases fúngicas foram semi-purificadas usando diferentes métodos. A pectinase produzida por *A. fumigatus* foi purificada utilizando uma coluna de troca iônica (CM-Sephadex), seguida por filtração por gel (Sephacryl S-200), resultando em apenas 4,45 vezes de purificação e rendimento de 26,16%, conforme descrito por Okonji et al. (2019). A pectinase de *A. niger* MTCC 478 também foi purificada utilizando dois passos, primeira por precipitação em acetona, seguida de outra coluna de troca iônica (CM-celulose) como relatado por Anand, Yadav e Yadav (2017), obtendo apenas 15,3 vezes de purificação e um rendimento de 1,2%. Além disso, a pectinase de *A. japonicus* foi purificada utilizando uma coluna de troca iônica (DEAE-Fractogel) seguida de uma coluna de interação hidrofóbica (Phenyl-Sepharose), obtendo apenas 2,9 vezes de purificação e atividade específica de 7,9 U/mg, conforme estudo realizado por Guimarães et al. (2022).

5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE) e Zimograma

A purificação da pectinase foi investigada por meio de SDS-PAGE de 12%, seguindo a metodologia de Laemmli et al. (1970) com modificações, como descrito no item 4.6.1, (Figura 6). Foram aplicadas 50 µg de proteínas no gel e, após a corrida e coloração com o ProteoSilver™ Silver Stain Kit (Sigma Aldrich), observaram-se bandas correspondentes ao P1 (Figura 6B) e ao P2 (Figura 6C). Além disso, o zimograma revelou a atividade de pectinase tanto para o P1 (Figura 6D) quanto para o P2 (Figura 6E), indicado por bandas correspondentes à atividade enzimática. A massa molecular de P1 e P2 em sua forma nativa são semelhantes, ambos com aproximadamente 110 kDa.

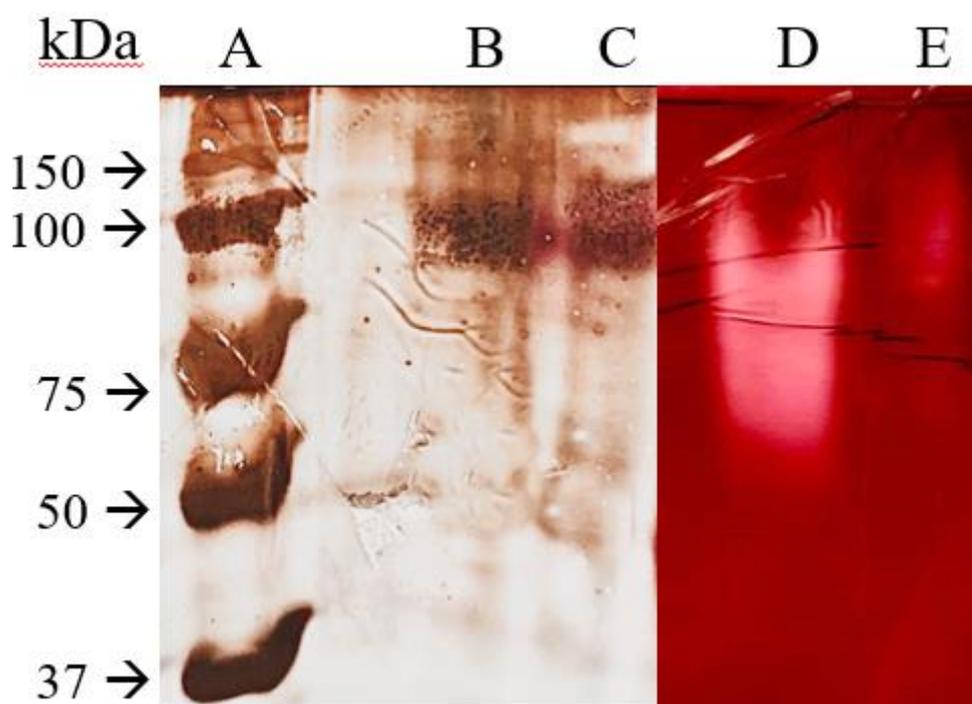


Figura 6. Perfil eletroforético da poligalacturonase semi-purificada em SDS-PAGE 12 %. (A) marcador de massa molecular (BioRad 1610363); (B) de P1 (50 μ g); (C) e P2 (50 μ g); (D) zimograma de P1(50 μ g); (E) zimograma de P2 (50 μ g).

A maioria das poligalacturonases purificadas possui pesos moleculares que variam de 30 a 70 kDa (Okonji et al., 2019), podendo alcançar até 115 kDa (Vaz et al., 2020). Na purificação de uma poligalacturonase de *A. niger* MTCC 3323, a enzima apresentou em sua forma nativa massa molecular de 106 kDa (Kant et al., 2013). Da mesma forma, uma poligalacturonase proveniente de *A. flavus* revelou um peso molecular de 66 kDa (Radha et al., 2019), enquanto uma exopoligalacturonase de *A. tuberginensis* apresentou um peso molecular de 78 kDa (Barense et al., 2001).

5.4 Caracterização bioquímica

5.4.1 Efeito de temperatura e pH na atividade

Foram avaliados o pH e a temperatura ótimos para a atividade de cada enzima obtida a partir da coluna hidrofóbica, especificamente os picos coletados conhecidos como pico 1 (P1) e pico 2 (P2). Para a avaliação do pH, foram medidos valores dentro da faixa de pH 2,0 a 8,0. O P1 teve melhor atividade na faixa de pH de 3,0 a 6,0, atingindo seu pico de atividade ótima em pH 4,0 e, mantendo 68,7% da atividade acima de pH 7,0 (Figura 7A). Já o P2 teve pico de atividade em pH 5,0, apresentando uma queda de 15% (aproximadamente) em valores acima ou abaixo deste, como mostra a Figura 7B.

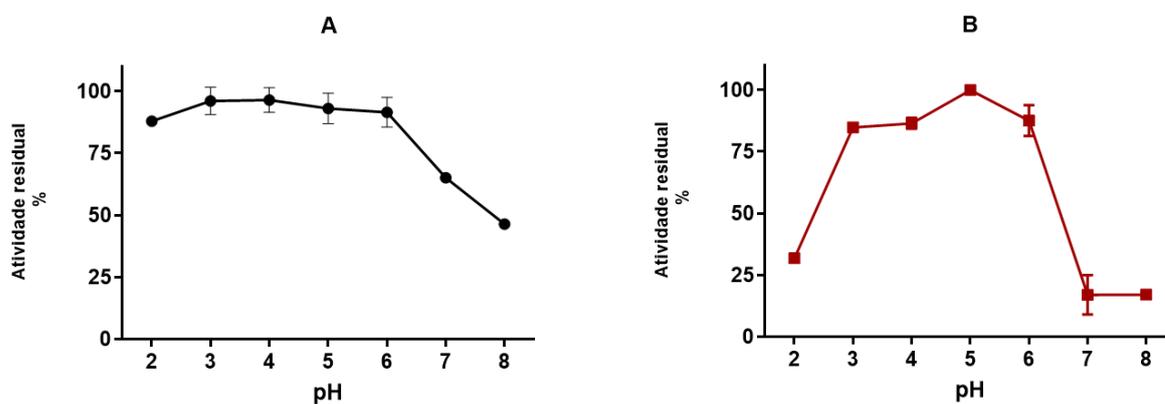


Figura 7. Efeito do pH na atividade das poligalacturonases semi-purificadas. (A) P1; (B) P2. A atividade enzimática foi determinada em tampão McIlvaine variando o pH entre 2,0 a 8,0, nas condições ótimas já preestabelecidas. As atividades residuais foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima. Os testes foram feitos em duplicata, realizado média e desvio padrão.

Quanto ao efeito da temperatura, as enzimas foram avaliadas em uma faixa de 40 °C a 70 °C, na presença de seu pH ótimo. Nestas condições, o P1 teve a melhor atividade entre 50 e 55 °C, com queda em temperaturas menores e acima de 65 °C, como mostra a Figura 8A. Já o P2 obteve a melhor atividade entre 50 e 60 °C, com atividade decaindo mais de 50% em temperaturas superiores (Figura 8B).

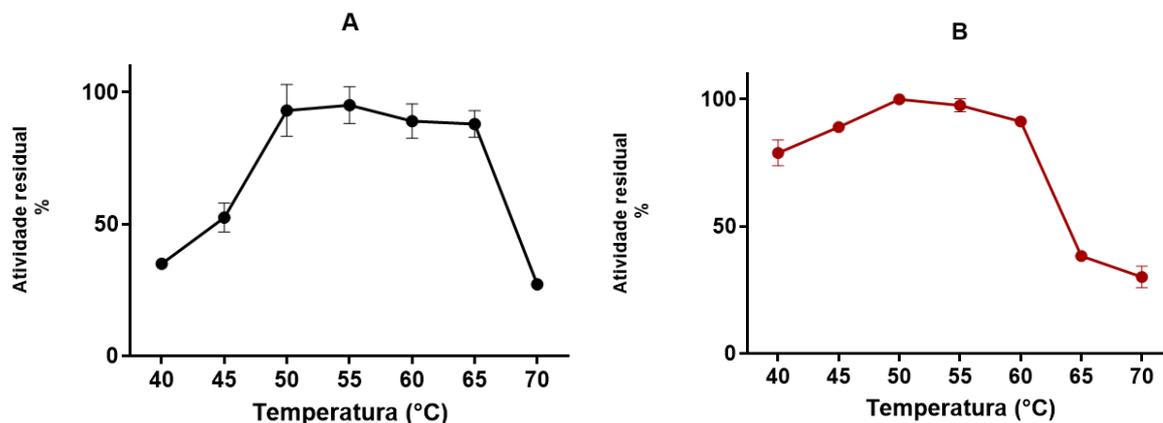


Figura 8. Efeito da temperatura na atividade das poligalacturonases semi-purificadas. (A) P1; (B) P2. A atividade enzimática foi determinada em temperaturas com variações entre 40 e 70°C, nas condições ótimas já preestabelecidas. As atividades residuais foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima. Os testes foram feitos em duplicata, realizado média e desvio padrão.

Várias cepas de *Aspergillus* sp. têm sido objeto de estudos de caracterização bioquímica de suas pectinases purificadas e semi-purificadas, revelando resultados similares. As pectinases purificadas de *A. fumigatus* e *A. awamori*, por exemplo, demonstraram atividade máxima em pH 5,0 e temperaturas de 60° C e 55° C em estudos realizados por Adedeji e Ezekiel (2019) e Okonji et al. (2019), respectivamente. Por outro lado, estudos conduzidos por Guimarães et al. (2022) e Anand, Yadav e Yadav (2017) relataram que as pectinases de *A. japonicus* e *A. niger* apresentaram atividade máxima em pH 4,0 e temperaturas ótimas entre 50 e 55° C. Logo, nota-se que as enzimas produzidas por *Aspergillus* sp., que atingem sua melhor atividade em uma faixa de pH ácido e temperaturas entre 50° C e 60° C, coincidindo com a faixa de pH e temperatura empregada produção da maioria dos sucos comerciais, são excelentes candidatas para a extração de pectina em sucos de frutas e na vinificação.

5.4.2 Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da enzima

Foram investigados os efeitos do pH e da temperatura na estabilidade das poligalacturonases semi-purificadas (P1 e P2).

Para avaliar a influência do pH, as poligalacturonases semi-purificadas foram avaliadas na faixa de pH 3,0 a 5,0. Dentro desse intervalo, P1 se manteve estável durante os 240 minutos (91,16%) em pH 4,0, mas perdeu 50 % da atividade após 60 minutos de incubação nos pH 3,0 e 5,0 (Figura 9A).

A poligalacturonase P2, por sua vez, manteve estável até 120 minutos de incubação nos pH 3,0, 4,0 e 5,0, apresentando 45, 26 e 5% de aumento de atividade, respectivamente. A estabilidade também foi mantida em 240 minutos nos pH 3,0 e 4,0 com 95,1 e 85,53% de atividade, respectivamente (Figura 9B).

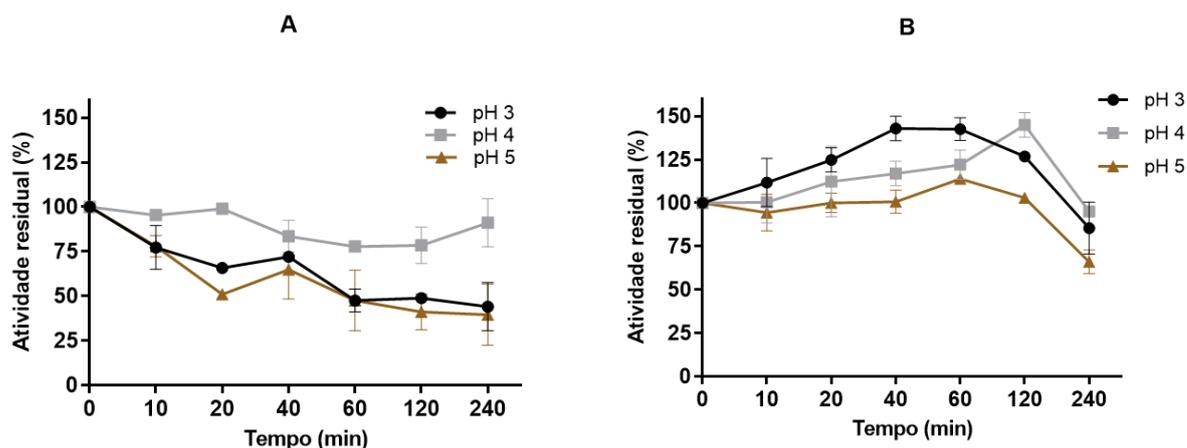


Figura 9. Efeito do pH na estabilidade da poligalacturonases semi-purificada. (A) P1; (B) P2. A enzima foi incubada em pHs 3,0, 4,0 e 5,0 durante um período de até 240 minutos (4 h). Alíquotas foram retiradas nos tempos indicados para a dosagem de atividade enzimática residual conforme o item 4.7.2. Os testes foram feitos em duplicata, sendo realizado média e desvio padrão.

Estudos têm abordado o efeito na estabilidade de pectinases purificadas em diferentes faixas de pH. Fratebianchi et al. (2017) investigaram a estabilidade de uma endopoligalacturonase isolada de *Aspergillus sojae* e constataram que a enzima conseguiu preservar cerca de 75% de sua atividade após 120 minutos em pH ácidos (variando de 2,0 a 6,5). Outro estudo com pectinases purificadas de *A. niger* LFP-1 evidenciou uma maior estabilidade entre os valores de pH 3,5 e 4,5, com retenção de atividade por até 100 minutos durante a incubação (Jalil e Ibrahim, 2021). Além disso, a poligalacturonase purificada de *Thermoascus aurantiacus* também exibiu considerável retenção, chegando a 73% de sua atividade em pH mais ácidos (no intervalo de 3,0 a 6,5) (Martins et al., 2013).

A estabilidade da enzima foi igualmente investigada em temperaturas de 50°C, 55°C e 60°C. Notavelmente, a enzima P1 revelou um aumento de 33% na sua atividade após 40 minutos de incubação. P1 também se manteve estável durante todo o período de 240 minutos de incubação a 50, 55 e 60°C, com atividades de 86,4; 89,7 e 71,2% (Figura 10A).

Já a enzima P2 se manteve estável durante os 240 minutos de incubação nas temperaturas 55 e 60°C, com 87 e 88,5% de atividade, respectivamente. Enquanto a 50°C a enzima manteve até 78% de sua atividade após 60 minutos de incubação, chegando a 240 minutos com 60,2% de sua atividade (Figura 10B).

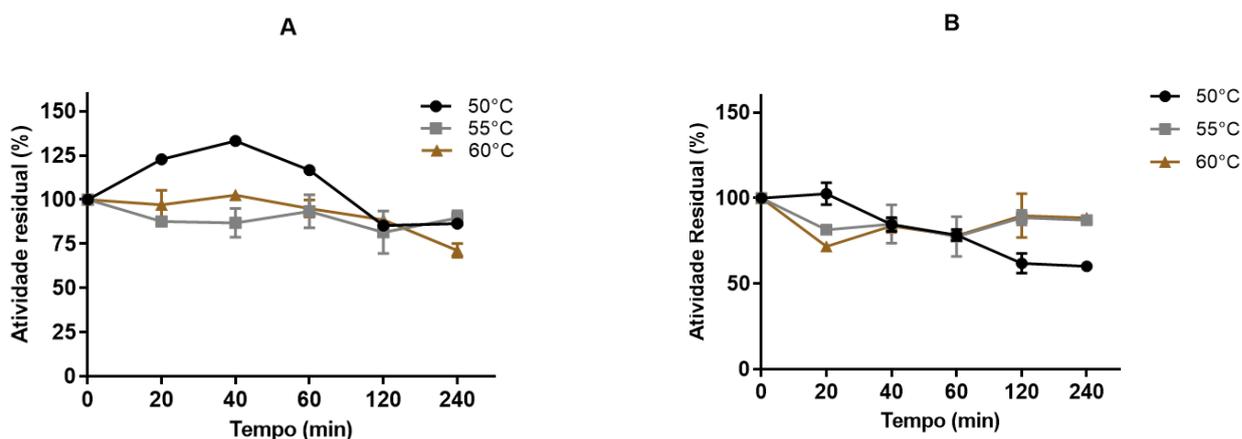


Figura 10. Efeito da temperatura na estabilidade das enzimas semi-purificadas. (A) P1; (B) P2. As poligalacturonases foram incubadas em seu pH ótimo em temperaturas de 50, 55 e 60°C durante um período de até 240 minutos. Alíquotas foram retiradas nos tempos indicados para a

dosagem de atividade enzimática residual conforme o item 4.7.2. Os testes foram feitos em duplicata, sendo realizado média e desvio padrão.

Resultados comparáveis foram observados por Okonji et al. (2019) ao estudarem a pectinase purificada de *Aspergillus fumigatus*. Essa enzima conservou 100% de sua atividade a 60°C, porém sofreu uma redução de cerca de 50% após 120 minutos. Além disso, investigações sobre a termoestabilidade da pectinase purificada de *Aspergillus niger* LFP-1 revelaram uma retenção satisfatória de atividade em temperaturas inferiores (40°C, 45°C e 50°C), mas uma queda acentuada após 20 minutos de incubação a 55°C, resultando em uma retenção de apenas 41,17% da atividade após 100 minutos de incubação (Jalil e Ibrahim, 2021). De maneira similar, Fratebianchi et al. (2017) apresentou a termoestabilidade de uma poligalacturonase purificada de *A. sojae*, na qual apenas 25% da atividade persistiu após 210 minutos de incubação a 50°C.

No contexto do processamento industrial de frutas com foco na produção de sucos, a aplicação de altas temperaturas é uma prática comum e tendo em vista que o pH dos sucos comerciais geralmente oscila entre 3,0 e 5,5 (Berger, 2014), torna-se evidente que uma enzima capaz de manter sua estabilidade dentro da faixa de 50 a 60°C e em meios mais ácidos seria altamente adequada para atender a essa demanda. Vale ressaltar, ainda, que a otimização do processo de clarificação pode culminar em um substancial redução do tempo necessário, frequentemente alcançando apenas 1 hora, especialmente quando conduzido a 50°C (Fratebianchi et al., 2017; Tucker e Woods, 1995).

5.4.3 Parâmetros Cinéticos

Com o propósito de investigar a afinidade pelos substratos, foi realizada a análise dos parâmetros cinéticos das poligalacturonases semi-purificadas (P1 e P2) e a pectinase comercial, visando a comparação entre eles. Essa análise foi conduzida empregando pectina cítrica, pectina de maçã e ácido poligalaturônico (PGA) como substratos, em concentrações variando de 0,5 a 10 mg/mL a uma temperatura de 50 °C, conforme detalhado no item 4.7.3.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos das poligalacturonases semi - purificada de *Aspergillus niger* M2 e comercial

	P1				P2				Comercial			
	V_{max} (U/mg)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mg/ml)	k_{cat}/K_M (ml s ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max} (U/mg)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mg/ml)	k_{cat}/K_M (ml s ⁻¹ mg ⁻¹)	V_{max} (U/mg)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mg/ml)	k_{cat}/K_M (ml s ⁻¹ mg ⁻¹)
PC	30,00	728,7	2,47	295,02	18,64	510,7	2,19	233,19	17,80	501,4	2,13	235,39
PM	27,80	636,6	2,62	242,97	30,29	660,9	2,75	240,32	17,44	397,9	2,63	151,29
PGA	41,00	1274,6	1,93	660,41	36,15	1338,9	1,62	826,48	9,32	494,9	1,13	437,96

Comparação entre os parâmetros cinéticos das poligalacturonases semi-purificadas (P1 e P2) e a enzima comercial utilizando pectina cítrica (PC), pectina da maçã (PM) e ácido poligalacturônico (PGA) como substratos nas concentrações de 0,5 a 10 mg/mL.

Os resultados das análises cinéticas revelaram que as duas poligalacturonases semi-purificadas de *Aspergillus niger* M2 demonstraram uma afinidade superior pelo ácido poligalacturônico. Para P1, os valores de K_M e V_{max} foram de 1,93 mg/ml e 41 U/mg, respectivamente, enquanto para P2, foram de 1,62 mg/ml e 36,15 U/mg. Em contraste, a enzima comercial apresentou um valor de K_M de 1,13 mg/ml e um V_{max} de 9,32 U/mg, sendo a velocidade inferior ao apresentado pelas poligalacturonases semi - purificadas. P1 e P2 também apresentaram maior eficiência catalítica (P1 com 660,41 mls⁻¹ mg⁻¹ e P2 com 826,48 ml s⁻¹mg⁻¹) maior do que a pectinase comercial (437,96 ml s⁻¹ mg⁻¹) neste mesmo substrato. Já na presença da pectina de maçã, a poligalacturonase P1 exibiu um K_M de 2,62 mg/ml e um V_{max} de 27,8 U/mg, e, a poligalacturonase P2 demonstrou um K_M de 2,75 mg/ml e um V_{max} de 30,29 U/mg no mesmo substrato. Por outro lado, a pectinase comercial apresentou um K_M de 2,63 mg/ml e V_{max} de 17,44 U/mg semelhante aos apresentados pelas enzimas do P1 e P2. Quando aplicadas à pectina cítrica, P1 e P2 demonstraram K_M de 2,47 mg/ml e 2,19 mg/ml, respectivamente, enquanto a enzima comercial registrou 2,13 mg/ml para esse parâmetro. Quanto à V_{max} , as duas enzimas semi-purificadas alcançaram 30,00 U/mg para P1 e 18,64 U/mg para P2, enquanto a enzima comercial atingiu 17,80 U/mg (Tabela 3).

Foram conduzidos diversos estudos com o intuito de avaliar os parâmetros cinéticos de pectinases. Okonji et al. (2019) realizaram uma análise dos parâmetros cinéticos de uma pectinase purificada extraída de *Aspergillus fumigatus*, observando valores de K_M de 7,11

mg/ml, 6,01 mg/ml e 3,08 mg/ml para pectina cítrica, pectina de maçã e ácido poligalacturônico (PGA), respectivamente. Em outro contexto, uma exo-poligalacturonase proveniente de *Penicillium frequentans* exibiu um valor de K_M de 1,6 mg/ml e V_{max} de 2571 U/mg ao utilizar PGA como substrato (Barense et al., 2001). No caso da exo-poligalacturonase derivada de *A. niger* MTCC478, seu K_M foi calculado como 2,3 mg/ml quando empregado o PGA como substrato (Anand et al., 2017).

Além desses exemplos, a pectinase purificada a partir da linhagem *A. niger* LFP-1 manifestou um K_M de 3,89 mg/ml e V_{max} de 1701 U/mg ao usar pectina cítrica como substrato (Jalil e Ibrahim, 2021). Em um estudo paralelo, uma poligalacturonase originária de *Thermoascus aurantiacus* apresentou um valor de K_M de 1,58 mg/ml e V_{max} de 1553,1 U/mg quando submetida ao mesmo substrato (Martins et al., 2013).

Foi observado que as enzimas P1 e P2 apresentaram velocidades e eficiência catalítica superiores nos três substratos testados em comparação com a pectinase comercial, destacando-se especialmente na presença do ácido poligalacturônico. Além disso, os valores de K_M demonstrados por P1 e P2 sugerem que a pectinase semi-purificada obtida a partir de *A. niger* M2 é uma poligalacturonase. Esta conclusão é amparada por estudos prévios que indicam que diferentes pectinases exibem distintos graus de afinidade para diferentes substratos, os quais variam de acordo com a porcentagem de esterificação dos substratos e o nível de especificidade da enzima em questão (Guimaraes et al, 2022). Logo, estes resultados ressaltam a relevância dessas enzimas como poligalacturonases altamente promissoras para aplicações industriais.

5.5 Aplicação das enzimas na clarificação de suco de frutas

A clarificação de sucos é um processo fundamental na indústria de bebidas que vai além da estética, influenciando a qualidade, o sabor, o prazo de validade e a eficiência de processamento dos sucos de frutas. A clareza no suco contribui para uma textura melhorada, sabor consistente e uma aparência visualmente atraente. A remoção de sabores potencialmente indesejáveis preserva o sabor natural da fruta e prolonga a vida útil do produto, reduzindo as oportunidades de deterioração. Esse processo também agiliza as operações de produção, minimizando o entupimento e a incrustação do equipamento. Dada a significativa relevância das informações apresentadas, as poligalacturonases (P1 e P2) e a comercial foram empregadas

nos processos de clarificação, sendo usadas 8 polpas de sucos provenientes de diversas frutas, na proporção de 1:1 (2 ml de extrato enzimático: 2 ml de polpa). A incubação foi conduzida por um período de 4 horas a 40°C (Tabelas 4).

Os resultados derivados da aplicação das enzimas foram evidenciados na polpa de carambola, com um aumento de $270.6 \pm 2.4\%$ na capacidade de clarificação utilizando a poligalacturonase P1, e $248.8 \pm 6.3\%$ com P2, sendo superior ao da enzima comercial ($159 \pm 0.2\%$). Quanto às polpas de manga, o P1 demonstrou uma taxa de clarificação de $157.6 \pm 0.2\%$, enquanto o P2 alcançou $159.5 \pm 2.2\%$ de clarificação na variedade Haden. Em contraposição, a enzima comercial atingiu somente $84.4 \pm 4.3\%$ de clarificação.

Com a manga Tommy, as enzimas apresentaram clarificação de $158.8 \pm 3.4\%$ (P1) e $168.1 \pm 1.7\%$ (P2), contrastando significativamente com a enzima comercial que obteve apenas $72.4 \pm 3.0\%$ de clarificação. Similarmente, na variedade de manga Palmer, a comercial apresentou uma clarificação de $60,5 \pm 0,2\%$, enquanto as enzimas de *Aspergillus niger* M2 demonstraram aumentos de $114,3 \pm 2,5\%$ (P1) e $104,6 \pm 3,0\%$ (P2).

Tabela 4. Clarificação de sucos de fruta utilizando poligalacturonases (P1 e P2) semi-purificadas e uma pectinase comercial

Fruta	Controle	P1	P2	Comercial
Banana da Terra	-	$142,0 \pm 0,7^a$	$142,5 \pm 3,7^a$	$88,16 \pm 4,0^b$
				
Carambola	-	$270,6 \pm 2,4^c$	$248,8 \pm 6,3^b$	$159 \pm 0,2^a$
				
Cupuaçu	-	$39,1 \pm 0,4^b$	$39,1 \pm 0,2^b$	$26,8 \pm 0,3^a$
				
Goiaba Branca	-	$183,9 \pm 2,0^a$	$183,1 \pm 6,0^a$	$181,7 \pm 0,9^a$

				
	-	$42,7 \pm 1,5^b$	$47,4 \pm 1,3^b$	$14,5 \pm 6,2^a$
Maçã Argentina				
	-	$157,6 \pm 0,2^b$	$159,5 \pm 2,2^b$	$84,4 \pm 4,3^a$
Manga Haden				
	-	$114,3 \pm 2,5^c$	$104,6 \pm 3,0^b$	$60,5 \pm 0,2^a$
Manga Palmer				
	-	$158,8 \pm 3,4^b$	$168,1 \pm 1,7^b$	$72,4 \pm 3,0^a$
Manga Tommy				

Os valores apresentados representam as médias \pm desvios-padrão de duas replicatas. Os cálculos de % de clarificação foram feitos conforme Rosmine et al. (2017). As médias que partilham a mesma letra na linha não apresentam diferenças estatisticamente significativas, conforme determinado pelo teste Tukey utilizando a % de clarificação ($p < 0,05$).

Vários estudos têm sido relatados na literatura sobre a ação enzimática na clarificação de sucos de frutas. Essas pesquisas investigam uma gama de variáveis, incluindo viscosidade, turbidez, rendimento e clarificação, empregando uma diversidade de abordagens metodológicas. Wagh et al. (2022) demonstrou a capacidade das pectinases purificadas de *A. niger* em clarificar o suco de maçã. Da mesma forma, a pectinase produzida por *A. niger* apresentou notável habilidade em reduzir a viscosidade em sucos de maçã, com uma diminuição de até 40%, e em sucos de mirtilo, com uma redução de 60% (Sandri et al., 2013).

A aplicação de pectinases purificadas de *Yarrowia phangngaensis* XB3 também merece destaque, alcançando uma taxa de clarificação de 59,84% em suco de maçã (Ezeh et al., 2023). A pesquisa conduzida por Prajapati et al. (2021) resultou em um índice de clarificação de

89,12% ao utilizar pectinases produzidas por *Bacillus subtilis* BK-3, além de atingir 51,36% na clarificação de suco de abacaxi. Todos esses tratamentos foram realizados ao longo de um período de 2 horas a 45°C.

Em consonância com essas descobertas, uma exo-poligalacturonase originária de *Penicillium janczewskii* apresentou notáveis taxas de clarificação em diferentes sucos. O resultado foi de 83,64% para suco de maçã, 92,73% para suco de manga e 89,33% para suco de pêssgo (Amin et al., 2020). Estudos realizados por Guimarães et al. (2023) com a pectinase de *A. japonicus* demonstrou a clarificação de 85,56 e 46,7% para suco de manga Haden e Palmer, respectivamente e, 46,4% para goiaba branca e 49,04% para banana-da-terra.

Os resultados deste estudo destacam a eficácia das poligalacturonases semi-purificadas provenientes de *Aspergillus niger* M2 na clarificação de sucos de frutas, superando significativamente os resultados da clarificação feita pela pectinase comercial, especialmente nos sucos de banana da terra, maçã argentina e mangas haden e tommy. Além de demonstrarem resultados superiores a estudos semelhantes. Reforçando, de maneira contundente, o potencial dessas enzimas para aprimorar não apenas a qualidade sensorial e a clareza dos sucos, mas também para estender sua vida útil e otimizar os processos de produção.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, as poligalacturonases produzidas por *Aspergillus niger* M2 foram semi-purificadas por meio de dois processos cromatográficos, resultando em dois picos com atividade pectinolítica (P1 e P2). Ambas as enzimas demonstraram atividade ótima em pH ácido (4,0 - 5,0) e temperaturas entre 50 e 55°C, mantendo-se estáveis em temperaturas de 50 – 60°C por até 240 minutos, condições favoráveis para o processo de clarificação de sucos na indústria alimentícia. Além disso, apresentaram um maior valor de V_{max} e melhor eficiência catalítica em comparação com a pectinase comercial nos três substratos avaliados (pectina cítrica, pectina da maçã e PGA), destacando uma afinidade particular pelo PGA e confirmando sua natureza como poligalacturonases. As poligalacturonases produzidas por *A. niger* M2 também demonstraram resultados promissores na clarificação de sucos de carambola e manga, sendo significativamente superior aos apresentados pela enzima comercial (Pectinex). Isso destaca sua viabilidade como uma candidata potencial para aplicação na indústria alimentícia, especialmente na produção de sucos de frutas, onde sua eficácia comprovada pode contribuir significativamente para aprimorar a qualidade dos produtos finais, aumentar a eficiência dos processos de produção e atender às crescentes demandas por soluções mais eficazes e naturais.

REFERÊNCIAS

- ADAPA, V., RAMYA, L. N., PULICHERLA, K. K., RAO, K. S. Cold active pectinases: advancing the food industry to the next generation. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 172, p. 2324-2337, 2014
- AL-NAJADA, A. R.; AL-HINDI, R. R.; MOHAMED, S. A. Characterization of polygalacturonases from fruit spoilage *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus tubingensis*. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 34, p. 8527-8536, 2012.
- AHMED, A.; SOHAIL, M. Characterization of pectinase from *Geotrichum candidum* AA15 and its potential application in orange juice clarification. *Journal of King Saud University - Science*, v. 32, n. 1, p. 955–961, 2020.
- 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.
- AMIN, F.; MOHSIN, A.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Production, thermodynamic characterization, and fruit juice quality improvement characteristics of an Exo-polygalacturonase from *Penicillium janczewskii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 1868, n. 5, p. 140379, 2020.
- ANAND, G.; YADAV, S.; GUPTA, R.; YADAV, D. Pectinases: from microbes to industries. *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*. Elsevier, 2020. p. 287-313, 2020
- ANAND, G.; YADAV, S.; YADAV, D. Production, purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 suitable for clarification of orange juice. *3 Biotech*, v. 7, p. 1-8, 2017.
- BARENSE, R. I.; CHELLEGATTI, M. A. D. S.; FONSECA, M. J. V.; SAID, S. Partial purification and characterization of exopolygalacturonase II and III of *Penicillium frequentans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, n. 4, p. 327–330, 2001.
- BEHERA, B.C. Citric acid from *Aspergillus niger*: a comprehensive overview. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 46, p. 727–749, 2020.
- BHARATHIRAJA, S.; SURIYA, J., KRISHNAN, M., MANIVASAGAN, P., & KIM, S. K. Production of Enzymes From Agricultural Wastes and Their Potential Industrial Applications. *Advances in Food and Nutrition Research*. v. 80. p. 125–148, 2017.
- CAIRNS, T. C.; NAI, C.; MEYER, V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. *Fungal Biology and Biotechnology*, v. 5, n. 1, p. 13, 2018.
- CHAN, S. Y.; CHOO, W. S.; YOUNG, D. J.; LOH, X. J. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydrate Polymers*, v. 161, p. 118–139, 2017.
- 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.

DALBØGE, H. Expression cloning of fungal enzyme genes; a novel approach for efficient isolation of enzyme genes of industrial relevance. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 21, n. 1, p. 29–42, 1997.

DE ASSIS, S. A.; LIMA, D. C.; DE FARIA OLIVEIRA, O. M. M. Activity of pectinmethylesterase, pectin content and vitamin C in acerola fruit at various stages of fruit development. *Food Chemistry*, v. 74, n. 2, p. 133–137, 2001.

DE SOUZA, T. S. P.; KAWAGUTI, H. Y. Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases: Applications in the Food and Beverage Industry. *Food and Bioprocess Technology*, v. 14, n. 8, p. 1446–1477, 2021.

DEY, T. B.; ADAK, S.; BHATTACHARYA, P.; BANERJEE, R. Purification of polygalacturonase from *Aspergillus awamori* Nakazawa MTCC 6652 and its application in apple juice clarification. *LWT - Food Science and Technology*, v. 59, n. 1, p. 591–595, 2014.

DIAZ, A.B., ALVARADO, O., DE ORY, I., CARO, I., BLANDINO, A. Enhance hydrolytic enzymes production by *Aspergillus awamori* on supplemented grape pomace. *Food Bioprod. Process.* v. 90, p. 72–78, 2013.

ESAWY, M. A.; GAMAL, A. A.; KAMEL, Z. Optimization of *Aspergillus niger* NRC1ami Pectinase Using Citrus Peel Pectin, Purification, and Thermodynamic Characterization of the Free and Modified Enzyme. *Waste and Biomass Valorization*, v. 13, n. 12, p. 4823–4837, 2022.

EZEH, N. O.; NWAGU, T. N.; 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.

FERDEŞ, M.; ZABAVA, B. Ş.; PARASCHIV, G.; IONESCU, M.; DINCA, M. N.; MOICEANU, G. Food Waste Management for Biogas Production in the Context of Sustainable Development. *Energies*, v. 15, n. 17, p. 6268, 2022.

FRATEBIANCHI, D.; CAVELLO, I. A.; CAVALITTO, S. F. Purification and Biochemical and Kinetic Properties of an Endo-Polygalacturonase from the Industrial Fungus *Aspergillus sojae*. *Microbial Physiology*, v. 27, n. 2, p. 102–109, 2017.

GOLDMAN, G. H.; OSMANI, S. A. *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods*. CRC Press, 2007.

GUIMARÃES, N. C. DE A. 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: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2023.

GUIMARÃES, N. C. DE A.; GLIENKE, N. N.; GALEANO, R.M.S.; RULLER, R.; ZANOELO, F. F.; MASUI, D. C.; GIANNESI, G. 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, 2022.

GUIMARÃES, N. C. DE A.; GLIENKE, N. N.; CONTATO, A. G.; GALEANO, R. M. S.; MARCHETTI, C. R.; ROSA, M. P. G.; TELES, J. S. DE S.; SIMAS, A. L. O.; ZANOELO, F. F.; MASUI, D. C.; GIANNESI, G. C. Production and Biochemical Characterization of *Aspergillus japonicus* Pectinase Using a Low-Cost Alternative Carbon Source for Application in the Clarification of Fruit Juices. *Waste and Biomass Valorization*. P. 1 – 10, 2023.

GUGNANI, H.C. Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Front Biosci*, v. 8, p. 346-357, 2003.

HAILE, S.; AYELE, A. Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications. *The Scientific World Journal*, v. 2022, p. 1–15, 2022.

HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; VIBE SCHELLER, H. Biosynthesis of Pectin. *Plant Physiology*, v. 153, n. 2, p. 384–395, 2010.

HOONDAL, G.; TIWARI, R.; TEWARI, R.; DAHIYA, N. B. Q. K.; BEG, Q. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n. 4, p. 409–418, 2002.

INFANTE, J. D. C. Imobilização e caracterização bioquímica de mananases e pectinases produzidas por *Aspergillus brasiliensis*: potencial para aplicação na clarificação de sucos de frutas. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2020.

JALIL, M. T. M.; IBRAHIM, D. Partial Purification and Characterisation of Pectinase Produced by *Aspergillus niger* LFP-1 Grown on Pomelo Peels as a Substrate. *Tropical Life Sciences Research*, v. 32, n. 1, p. 1–22, 2021.

JOHN, J.; KAIMAL, K. S.; SMITH, M. L.; RAHMAN, P. K.; CHELLAM, P. V. Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 162, p. 1086–1099, 2020.

JOSHI, M. N. M.; RAVINDRA, A. Use of Citrus Limetta peels for pectinase production by marine *Bacillus Subtilis*. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, v. 12, p. 75-83, 2013.

KANT, S.; VOHRA, A.; GUPTA, R. Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 3323. *Protein Expression and Purification*, v. 87, p. 11–16, 2013.

KARMAKAR, S.; DE. Pectin removal and clarification of juices. In: *Separation of functional molecules in food by membrane technology*. Academic Press, 2019. p. 155-194.

KASHAYP, D. R.; VOHRA, P. K.; SONI, S. K.; TEWARI, R. Degumming of bael (*Grewia optiva*) bast fibres by pectinolytic enzyme from *Bacillus* sp. DT7. *Biotechnology Letters*, v. 23, n. 16, p. 1297–1301, 2001.

KAVUTHODI, B.; SEBASTIAN, D. Review on bacterial production of alkaline pectinase with special emphasis on *Bacillus* species. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, v. 11, 2018.

KHARAZMI, S.; TAHERI-KAFRANI, A. Bi-enzymatic nanobiocatalyst based on immobilization of xylanase and pectinase onto functionalized magnetic nanoparticles for efficient fruit juice clarification. *LWT*, v. 183, p. 114914, 2023.

- KOHLI, P.; GUPTA, R. Alkaline pectinases: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4, n. 3, p. 279–285, 2015.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- MADDEN, D. Enzymes in fruit juice production. Anon. *A Jam and Out of Juice*, p. 1-10, 2000.
- MAGHRABY, Y. R.; EL-SHABASY, R. M.; IBRAHIM, A. H.; AZZAZY, H. M. E. S. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega*, v. 8, n. 6, p. 5184–5196, 2023.
- MAKTOUF, S.; NEIFAR, M.; DRIRA, S. J.; BAKLOUTI, S.; FENDRI, M.; CHÂABOUNI, S. E. Lemon juice clarification using fungal pectinolytic enzymes coupled to membrane ultrafiltration. *Food and Bioproducts Processing*, v. 92, n. 1, p. 14–19, 2014.
- MARTINS, E. D. S.; LEITE, R. S. R.; SILVA, R.; GOMES, E. Purification and Properties of Polygalacturonase Produced by Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus* CBMAI-756 on Solid-State Fermentation. *Enzyme Research*, v. 2013, p. 1–7, 2013.
- MARTINS, E. D. S.; LEITE, R. S. R.; 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.
- MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. *Journal of Biological Chemistry*, v. 49, n. 1, p. 183–186, 1921.
- MESQUITA, M.; SANTOS, E.; KASSUYA, C. A.; SALVADOR, M. J. Chimarrão, terere and mate-tea in legitimate technology modes of preparation and consume: A comparative study of chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-anxiety properties of the mostly consumed beverages of *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 279, p. 114401, 2021.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- NIGHOJKAR, A.; PATIDAR, M. K.; NIGHOJKAR, S. Pectinases: Production and Applications for Fruit Juice Beverages. *Processing and Sustainability of Beverages*. Elsevier, 2019. p. 235–273.
- OKONJI, R. E.; ITAKORODE, B. O.; OVUMEDIA, J. O.; ADEDEJI, O. S. Purification and biochemical characterization of pectinase produced by *Aspergillus fumigatus* isolated from soil of decomposing plant materials. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, v. 7, n. 3, p. 1–8, 5 abr. 2019.
- OLUSEUN ADEJUMO, I.; ADEBUKOLA ADEBIYI, O. Agricultural Solid Wastes: Causes, Effects, and Effective Management. *Strategies of Sustainable Solid Waste Management*. BoD–Books on Demand, 2021.
- OMEJE, K. O.; NNOLIM, N. E.; EZEMA, B. O.; OZIOKO, J. N.; OSSAI, E. C.; EZE, S. O. Valorization of agro-industrial residues for pectinase production by *Aspergillus aculeatus*:

Application in cashew fruit juice clarification. *Cleaner and Circular Bioeconomy*, v. 4, p. 100038, 2023.

PALANIVELU, P. Polygalacturonases: Active site analyses and mechanism of action. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 5, n 2, p. 148-162, 2006.

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 Microbiol*, v. 1, n. 1, p. 11, 2017.

POLIZELI, M. DE L. T. DE M.; DAMÁSIO, A. R. D. L., MALLER, A., CABRAL, H., POLIZELI, A. M.; RAI, M. Pectinases produced by microorganisms: properties and applications, 2013.

PRAJAPATI, J.; DUDHAGARA, P.; PATEL, K. Production of thermal and acid-stable pectinase from *Bacillus subtilis* strain BK-3: Optimization, characterization, and application for fruit juice clarification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 35, p. 102063, 2021.

RADHA, A.; SNEHA, R.; KIRUTHIGA, R.; PRIYADHARSHINI, P.; PRABHU, N. A Review on Production of Polygalacturonase Using Various Organisms and Its Applications. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*, v. 5, p. 1–12, 2019.

RAMADAN, M. F. Enzymes in fruit juice processing. *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*. Elsevier, 2018. p. 45–59.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHCHORN, S. E. *Biologia vegetal*. 8a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

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, p. 393–401, 2017.

RUIZ, H. A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; RODRÍGUEZ, R.; CONTRERAS; ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 65, p. 90–95, 2012.

SANDRI, I. G.; FONTANA, R. C.; BARFKNECHT, D. M.; DA SILVEIRA, M. M. Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT - Food Science and Technology*, v. 44, n. 10, p. 2217–2222, 2011.

SANDRI, I. G.; LORENZONI, C. M. T.; FONTANA, R. C.; DA SILVEIRA, M. M. 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, n. 2, p. 469–475, 2013.

SANT'ANA, D. A.; DE OLIVEIRA, M. S.; DORSA, A. C. *A cultura do tereré sul-mato-grossense e o desenvolvimento local*. 2016.

SANTI, L.; BERGER, M.; DA SILVA, W. O. B. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. *Revista Caderno Pedagógico*, v. 11, n. 1, 2014.

- 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 (Moscow)*, v. 68, p. 559–569, 2003.
- SHET, A. R.; MUHSINAH, A.B.; ALSAYARI, A.; ACHAPPA, S.; DESAI, S.V.; MAHNASHI, M.H.; MUDDAPUR, U.M.; SHAIKH, I.A.; MANNASAHEB, B.A.; KHAN, A.A. Media Optimization by Response Surface Methodology for the Enhanced Production of Acidic Extracellular Pectinase by the Indigenously Isolated Novel Strain *Aspergillus cervinus* ARS2 Using Solid-State Fermentation. *Fermentation*, v. 8, n. 10, p. 485, 2022.
- SHRESTHA, S.; RAHMAN, MD. S.; QIN, W. New insights in pectinase production development and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 105, n. 24, p. 9069–9087, 2021.
- SIDDIQUI, MOHD. A.; PANDE, V.; ARIF, M. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Rhizomucor pusillus* Isolated from Decomposting Orange Peels. *Enzyme Research*, v. 2012, p. 1–8, 17 out. 2012.
- SINGH, R.; SINGH, R. K. Role of Enzymes in Fruit juices Clarification during Processing: A review. 2015.
- TAPRE, A.; JAIN, R. K. Pectinases: Enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal*, v. 21, p. 447–453, 2014.
- TOCHI, B. N.; WANG, Z., XU, S. Y., & ZHANG, W. The influence of a pectinase and pectinase/hemicellulases enzyme preparations on percentage pineapple juice recovery, particulates and sensory attributes. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 8, n. 8, p. 1184-1189, 2009.
- TUCKER, G. A.; WOODS, L. F. J. (Ed.). *Enzymes in food processing*. Springer Science & Business Media, 1995.
- VAUQUELIN, M. Analyse du tamarin. *Annales de chimie*. p. 92-106, 1790.
- VAZ, R.P.; VICI, A.C.; POLIZELI, M. DE L.T. DE M.; MAGALHÃES, P.O.; FILHO, E.X.F. Immobilization studies of a pectinase produced by *Aspergillus terreus*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 68, p. 197–208, 2020.
- VORAGEN, A. G.; COENEN, G. J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry*, v. 20, p. 263-275, 2009.
- WAGH, V.; PATEL, H.; PATEL, N.; VAMKUDOTH, K. R.; AJMERA, S. Pectinase Production by *Aspergillus niger* and Its Applications in Fruit Juice Clarification. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, v. 16, n. 4, p. 2724–2737, 2022.
- WANG, B.; DONG, F., CHEN, M., ZHU, J., TAN, J., FU, X. Advances in Recycling and Utilization of Agricultural Wastes in China: Based on Environmental Risk, Crucial Pathways, Influencing Factors, Policy Mechanism. *Procedia Environmental Sciences*, v. 31, p. 12–17, 2016.

YAMASHITA, B. B. V. G. Extração sequencial de compostos fenólicos e pectina da casca da manga assistida por ultrassom. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado, Porto alegre, 2017

ZAVALA-PÁRAMO, M. G.; VILLA-RIVERA, M. G.; LARA-MÁRQUEZ, A.; LÓPEZ-ROMERO, E.; CANO-CAMACHO, H. Applications of Fungal Pectinases. Encyclopedia of Mycology. Elsevier, 2021. p. 316–325.