

**URI – CAMPUS ERECHIM**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE  
POLIGALACTURONASE**

**GABRIEL BONETTO BAMPI**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**DEZEMBRO DE 2010**

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE  
POLIGALACTURONASE**

Gabriel Bonetto Bampi

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Prof. Helen Treichel, D. Sc  
Orientadora

---

Prof. Eunice Valduga, D. Sc.  
Orientadora

---

Prof. Morgana Karin Pierozan, D. Sc.  
UDESC

---

Prof. Geciane Toniazzo, D. Sc.  
URI-Campus de Erechim

Erechim, 20 de Dezembro de 2010.

*“A melhor maneira de ser feliz é acreditar na vida,  
sem afastar-se dos sonhos, porque sem eles você  
continua vivendo, mas deixa de existir.”*

(autor desconhecido)

*Dedico esta conquista em especial a minha família e a todos aqueles que fizeram parte deste trabalho de uma forma ou de outra e que sempre me apoiaram.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente obrigado a DEUS por me dar a vida e colocar pessoas maravilhosas em meu caminho para me ajudar a trilhar meu destino.

Para chegar até aqui, muitas pessoas foram necessárias... obrigado a minha mãe, a meu pai e ao meu irmão por acreditarem em mim e me apoiarem em tudo que faço.

Para concluir este trabalho precisei de várias mãos, agradeço muito à ajuda, a disposição e os momentos alegres de trabalho a todos do laboratório, em especial a Aline a Jamile e a Jonaina que me aguentaram por este período que passei realizando as práticas.

Obrigado as minhas queridas orientadoras, Helen e Eunice pela paciência e carinho com que me guiaram.

Enfim obrigado a todos que de uma forma ou de outra fizeram parte deste trabalho e que certamente fazem parte de minha história. **MUITO OBRIGADO A TODOS.**

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE  
POLIGALACTURONASE**

Gabriel Bonetto Bampi

Dezembro/2010

Orientadoras: Helen Treichel e Eunice Valduga.

**RESUMO:** O desenvolvimento de técnicas de imobilização é muito importante para proteger as enzimas da intervenção com o solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar inativação, impossibilitando a catálise da reação. Na maioria dos casos, após a imobilização, enzimas e micro-organismos mantêm ou mesmo aumentam a sua atividade e estabilidade além de facilitar sua recuperação e reutilização. Neste trabalho, investigou-se a imobilização da enzima poligalacturonase (PG), produzida por *Penicillium brasilianum*. A imobilização foi realizada por encapsulamento em suporte sólido por adsorção, baseado na geleificação do alginato de sódio e glutaraldeído, carvão ativado como suporte sólido orgânico, sacarose e extrato enzimático de poligalacturonase. As condições de imobilização da PG foram definidas empregando estratégia sequencial de planejamentos de experimentos. A máxima atividade de PG (17,28 U/mL) do extrato enzimático encapsulado foi obtida nas condições de imobilização de 5% (m/v) de alginato de sódio, 15% (v/v) de glutaraldeído, 3% (m/v) de carvão ativado, 3 mL/L de extrato enzimático e 50% (p/v) de sacarose em relação ao total de água e solução enzimática.

Avaliando a condição otimizada quanto a estabilidade em diversos pHs e temperaturas verificou-se que a enzima PG imobilizada apresentou os maiores tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) a 55°C (346,55 horas) e 25°C (231,03 horas) e estabilidade em pH 4,0; 5,0 e 9,0 o que faz da imobilização um importante agente protetor possibilitando a aplicação industrial da enzima em produtos que requerem maior variação de pH.

**Palavras-Chave:** Imobilização; *Penicillium brasilianum*; poligalacturonase; carvão ativado.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering.

**STUDY OF THE IMMOBILIZATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF  
POLYGALACTURONASE**

Gabriel Bonetto Bampi

December/2010

Advisors: Helen Treichel e Eunice Valduga.

**ABSTRACT:** The development of techniques of immobilization is very important to protect the enzymes from the intervention with the solvent, where the reaction is done, because it could cause inactivation, making unable the catalyses of the reaction. In the majority of the cases, after the immobilization, enzymes and micro-organisms keep or even increase its activity and stability, besides facilitating its recovering and reuse. In this paper, it was investigated the immobilization of the polygalacturonases enzyme (PG), produced by *Penicillium brasilianun*. The immobilization was done through encapsulation in solid support for absorption, based on the gelling of the sodium alginate and glutaraldehyde, coal activated as an organic solid support, sucrose and polygalacturonases enzymatic extract. The conditions of the immobilization of the PG were defined using sequential strategy of experimental design. The maximum activity of the PG (17,28 U/mL) of the encapsulated enzymatic extract was obtained in the conditions of immobilization of 5% (m/v) of sodium alginate, 15% of (v/v) glutaraldehyde, 3% (m/v) of activated coal, 3 mL/L of enzymatic extract and 50% (p/v) of sucrose in relation to the total of water and enzymatic solution.

Evaluating the condition optimized in relation to the stability in different pHs and temperatures, it was verified that the enzyme PG immobilized presented the major values of half life ( $t_{1/2}$ ) under 55°C (346,55 hours) and 25°C (231,03 hours) and stability in pH 4,0; 5,0 and 9,0 what makes the immobilization an important protector agent enabling the industrial application of the enzyme in products which require more variation of pH.

**Key words:** Immobilization; *Penicillium brasilianun*; polygalacturonases; activated coal.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso molecular de algumas substâncias pépticas .....	19
Tabela 2. Lista de micro-organismos utilizados para produção de poligalacturonase (PG) e suas respectivas referências .....	23
Tabela 3. Variáveis e níveis utilizados no planejamento $2^3$ .....	33
Tabela 4. Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo $2^2$ .....	34
Tabela 5. Variáveis e níveis estudados no DCCR ( $2^2$ ), para otimização da atividade. ....	35
Tabela 6. Matriz do planejamento fatorial completo $2^3$ (valores reais e codificados) e resposta em atividade da poligalacturonase.....	38
Tabela 7. Matriz do planejamento fatorial $2^2$ completo (valores codificados e reais) e resposta em atividade da poligalacturonase.....	40
Tabela 8. Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo $2^3$ para atividade de poligalacturonase .....	41
Tabela 9. Análise de variância das condições de imobilização da PG frente à atividade enzimática do planejamento completo $2^2$ , com 4 pontos axiais. ....	42
Tabela 10. Matriz do delineamento composto central rotacional $2^2$ (valores codificados e reais) e resposta em atividade da poligalacturonase. ....	45
Tabela 11. Valores das atividades enzimáticas versus os pHs estudados em função do tempo. ....	48
Tabela 12. Perfis de atividade da PG imobilizada a temperatura de 4°C. ....	51
Tabela 13. Perfis de atividade da PG imobilizada a temperatura de 25°C. ....	51
Tabela 14. Perfis de atividade da PG imobilizada a temperatura de 35°C. ....	52
Tabela 15. Perfis de atividade da PG imobilizada a temperatura de 45°C. ....	52

Tabela 16. Perfis de atividade da PG imobilizada a temperatura de 55°C. ....53

Tabela 17. Valores de  $K_d$  e tempos de meia vida estimados para enzima PG imobilizada.54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modo de ação das pectinases .....	21
Figura 2. Representação das Posições de ataque das exo e endo-poligalacturonase na molécula de pectina .....	22
Figura 4. Formação das microesferas da enzima imobilizada.....	30
Figura 3. Métodos para imobilização de enzimas .....	28
Figura 5. Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento $2^3$ , para a atividade da poligalacturonase (U/mL) do material imobilizado...	39
Figura 6. Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no DCCR, para a atividade da poligalacturonase (U/mL) do material imobilizado.....	46
Figura 7. Influência do pH na estabilidade da poligalacturonase imobilizada.....	49

## **LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS**

ANOVA – análise de variância

F – fator

kdA – quilodalton

p – probabilidade de significância

PDA – potato dextrose agar

PG – poligalacturonase

PGL – poligalacturonato liase

pH – potencial hidrogeniônico

PL – pectinato liase

PMG – polimetilgalacturonase

PMGE – polimetilgalacturonato esterase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
2.1 ENZIMAS.....	17
<b>2.1.1 Enzimas Pectinolíticas.....</b>	<b>18</b>
2.1.1.1 Classificação.....	19
2.1.1.2 Poligalacturonase (PG).....	20
<b>2.1.2 <i>Penicillium</i> sp.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1.3 Aplicações industriais das pectinases .....</b>	<b>25</b>
2.2 IMOBILIZAÇÃO .....	26
<b>2.2.1 Encapsulamento .....</b>	<b>28</b>
2.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	30
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
3.1 PRODUÇÃO DA POLIGALACTURONASE (PG) .....	31
3.2 IMOBILIZAÇÃO DA POLIGALACTURONASE (PG).....	32
3.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA PG IMOBILIZADA.....	34
<b>3.3.2 Efeito do pH na estabilidade da enzima imobilizada .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3.3 Efeito da estabilidade da enzima imobilizada a baixa e altas temperaturas</b>	<b>35</b>
<b>3.3.4 Determinação da atividade da poligalacturonase (PG) .....</b>	<b>36</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
4.1 IMOBILIZAÇÃO DA POLIGALACTURONASE .....	37
4.2 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA POLIGALACTURONASE .....	44
<b>4.2.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.2 Estabilidade da atividade da poligalacturonase (PG).....</b>	<b>47</b>
4.2.2.1 Influência do pH no estudo da estabilidade para a enzima poligalacturonase ..	48

4.2.2.2 Estabilidade da enzima imobilizada em diferentes temperaturas.....	50
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>6 SUGESTÕES .....</b>	<b>56</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente mais de 3.000 diferentes enzimas têm sido identificadas, muitas delas isoladas em sua forma pura. As enzimas podem ser encontradas em células animais, vegetais e micro-organismos, sendo consideradas catalisadoras, ou seja, elementos responsáveis por aumentar a velocidade de uma reação (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Os avanços tecnológicos dos últimos tempos permitiram um melhor conhecimento e caracterização enzimática expandindo largamente a utilização industrial das enzimas. O uso de enzimas varia de indústrias alimentícias a têxteis e de detergentes, por exemplo. A utilização de enzimas em processos industriais tem sido apontada como um fator que reduz largamente a energia necessária para a obtenção de alguns produtos manufaturados (ALMEIDA et al., 2003; KASHYAP et al., 2001; UENOJO & PASTORE, 2007).

O potencial biotecnológico das pectinases tem chamado atenção de pesquisadores mundialmente pela diversidade de aplicações nos processos industriais (NIGHOJKAR et al., 2006). As pectinases formam um grupo heterogêneo de enzimas que degradam substâncias pécicas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica. Enzimas pectinolíticas podem ser produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras (UENOJO & PASTORE, 2007).

As pectinases incluem pectina esterase, poligalacturonase, pectina liase, as quais variam conforme seu modo de ação. A poligalacturonase (PG) é usada na indústria de alimentos sendo usualmente derivada de diversos fungos em especial *Aspergillus niger* e *Kluyveromyces marxianus* (ZHENG & SHETTY, 2000). Na verdade, a busca de poligalacturonases com potencial industrial novo exige a descoberta de novas cepas microbianas e uma compreensão da relação estrutura-estabilidade desta enzima (TARI et

al., 2008).

As PGs fúngicas são requisitadas para diversos fins industriais, devido a uma maior atividade enzimática e uma faixa ótima de pH baixa, características adequadas para a maioria dos aplicativos industriais, especialmente nos setores de processamento de frutas e vegetais (DZIEZAK, 1991). Uma vez que as enzimas pectinolíticas são amplamente usadas no processamento de alimentos, é necessário estudar a sua performance durante a hidrólise e otimizar um processo de hidrólise enzimática de alto rendimento de pectina, utilizando-se baixo teor de enzimas (AKHNAZAROVA & KAFAROV, 1982). Para isso há um crescente interesse na preparação de pectinases imobilizadas para o uso em clarificação e despectinização de sucos de frutas, utilizando uma grande variedade de suportes e métodos. Na literatura, alguns métodos de imobilização tem sido desenvolvidas com o intuito de fornecer estabilidade as enzimas, facilitar sua recuperação e reuso (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI 2004; VILLENEUVE et al., 2000), empregando distintos materiais e métodos de preparação das microcápsula.

Com base neste contexto, este estudo visou avaliar a imobilização da poligalacturonase produzida a partir de *Penicillium brasilianum*, utilizando como ferramenta a técnica de planejamento experimental, bem como a caracterização parcial da enzima imobilizada em termos de temperatura e pH ótimos e de estabilidade.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ENZIMAS

A denominação *enzima*, proposta em 1867 pelo alemão Wilhelm Kühne, deriva da expressão grega *en zymç*, que significa “em fermentação” (ROSAS, 2010). Segundo Hoondal (2002), as enzimas são consideradas substâncias biocatalizadoras complexas extremamente eficientes e altamente específicas, sintetizadas no interior das células vivas, mas que também exercem atividades fora delas.

De maneira geral, as enzimas aumentam a velocidade das reações, pelo fato de diminuir a energia de ativação, formando mais rapidamente o complexo enzima-substrato e fazendo com que a reação ocorra mais rapidamente (UHLIG, 1998).

Quimicamente elas são classificadas como proteínas com estrutura química especial. Sua molécula é chamada haloenzima e contém um centro ativo (apoenzima) e algumas vezes um grupo não protéico (coenzima) (BOBBIO & BOBBIO, 1995). Algumas enzimas não são capazes de atuar sozinhas, requerendo a presença de cofatores, que são elementos não protéicos necessários para que a atividade catalítica da enzima se manifeste. Os cofatores na realidade são cosubstratos, pois sofrem uma reação química durante a reação, estes incluem desde íons metálicos simples até moléculas orgânicas (WISEMAN, 1991).

De acordo com Harger (1982), as enzimas são obtidas a partir de três grandes fontes: vegetais superiores (papaína do mamão, bromelina do abacaxi); animais superiores (enzimas pancreáticas, pepsina, catalase, renina) e micro-organismos (como por exemplo, as

amilases, proteases, pectinases, invertases, celulasas, entre outras) de origem fúngica ou bacteriana.

As enzimas extraídas de diferentes fontes e que catalizam a mesma reação química, não são quimicamente idênticas. As estruturas terciárias do centro ativo de enzimas homólogas são obrigatoriamente parecidas para unir-se ao mesmo substrato e catalizar a mesma reação, mas as estruturas primárias podem conter sutis diferenças que gerarão pequenas trocas na estrutura terciária global, alterando assim as condições ótimas para o bom funcionamento enzimático (WISEMAN, 1991).

O termo atividade enzimática se refere à produtividade da enzima sob condições padronizadas, descrevendo quanto de um dado substrato é convertido dentro de um determinado tempo e condição definida em um produto correspondente (UHLIG, 1998). A atividade da enzima é influenciada pela concentração de enzima, concentração de substrato e sua disponibilidade, concentração de cofatores, concentração e tipo de inibidor, o pH e a temperatura do meio. Todos estes parâmetros são analisados pela cinética enzimática permitindo um conhecimento da reação em estudo e permitindo-nos seu controle (WISEMAN, 1991).

A estabilidade enzimática se refere à manutenção da capacidade catalítica em função do tempo, portanto a busca por enzimas de alta estabilidade apresenta grande interesse econômico (UHLIG, 1998).

### **2.1.1 Enzimas Pectinolíticas**

Enzimas pectinolíticas ou pectinases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam substâncias pecticas presentes em células vegetais (WHITAKER, 1990). As pectinas são polissacarídeos que possuem um alto peso molecular sendo compostas por um

complexo coloidal de polissacarídeos ácidos, formado de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações  $\alpha$  1-4, parcialmente esterificados por grupos metil éster e parcial ou completamente neutralizadas por uma ou mais bases (íons sódio, potássio ou amônio) (KASHYAP et al., 2000).

O peso molecular das pectinas pode variar de 25 a 360 kDa (SAKAI et al., 1993), como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Peso molecular de algumas substâncias pépticas

Fonte	Peso molecular (kDa)
Maça e Limão	200 – 360
Pêra e Ameixa	25 – 35
Laranja	40 – 50
Mel de Abelha	40 – 50

Fonte: Sakai et al. (1993).

#### 2.1.1.1 Classificação

As enzimas pectinolíticas são classificadas de acordo com o mecanismo de ataque a galacturona da molécula (MARTIN et al., 2004), dividindo as pectinases em três grupos: pectina esterase, despolimerizantes e protopectinases (SAKAI, 1992):

a) *Protopectinases* são enzimas que solubilizam protopectina em pectina solúvel altamente polimerizada (KASHYAP et al., 2001). Além de este grupo ser pouco abundante, a degradação da pectina desperta pouco interesse comercial (ALKORTA et al., 1998).

b) *Pectina esterase* (polimetilgalacturonato esterase, PMGE) catalisa a hidrólise dos grupos metil éster de pectina, convertendo pectina em pectato e liberando metanol (GUMMADI & PANDA, 2003).

c) *Despolimerizantes* são classificadas em dois grupos de acordo com a clivagem hidrolítica (hidrolase) ou transeliminativas (liases) das ligações glicosídicas, utilizando a ácido pécico ou pectina como substrato (ALKORTA et al., 1998), sendo que estas são subdivididas em:

- Hidrolases: as hidrolases incluem as polimetilgalacturonases (PMG) e as poligalacturonases (PG). A PMG age hidrolisando polimetilgalacturonatos a oligometilgalacturonatos (RIZZATTO, 1999). Já a PG é a maior enzima com função hidrolítica, podendo apresentar ação endo- (randômica) ou exo- (sequencial) do ácido pécico (KASHYAP et al., 2001). Sua hidrólise ocorre nas ligações glicosídicas  $\alpha$  1-4, entre dois resíduos de ácido galacturônico (MUTLU et al., 1999).

- Liasas: as liases incluem polimetilgalacturato liase (PMGL) e a poligalacturonato liase (PGL). Ambas clivam ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos (KASHYAP, 2001). A PMGL quebra as ligações por transeliminação do hidrogênio dos carbonos da porção aglicona do substrato (pectina) (WHITAKER, 1994). A PGL catalisa a clivagem da ligação  $\alpha$  1-4, de ácido pécico por transeliminação (KASHYAP et al., 2001).

#### 2.1.1.2 Poligalacturonase (PG)

A reação de despolimerização da pectina acontece quando a poligalacturonase catalisa a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, que se localizam entre os resíduos de ácido galacturônico da cadeia da pectina, com a introdução de água pela ponte de hidrogênio (RESENDE et al., 2004), conforme Figura 1.

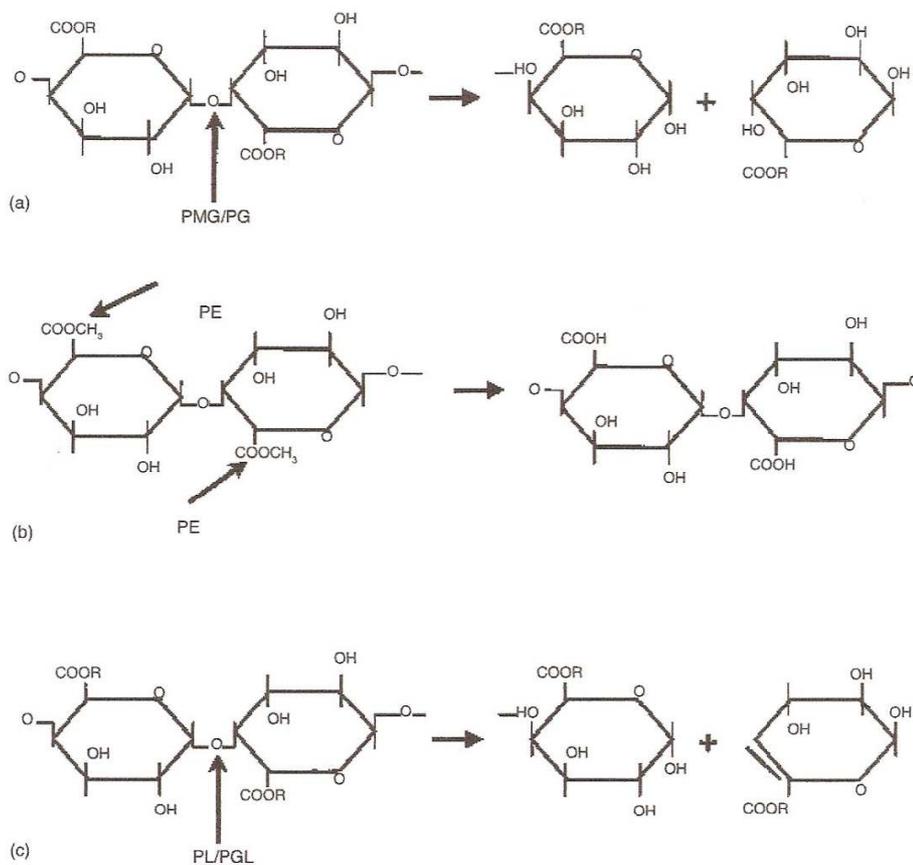


Figura 1. Modo de ação das pectinases: (a) R=H e CH<sub>3</sub> para PMG; (b) R=H para PE; (c) R=H para PGL e CH<sub>3</sub> para PL. As flechas indicam o local onde a pectinase reage com a substância pectica (Sathyanarayana & Panda, 2003).

As poligalacturonases podem proporcionar a clivagem dessa cadeia de diferentes formas. As exo-poligalacturonases (E.C. 3.2.1.67) promovem a redução da unidade externa ou terminal da cadeia poligalacturônica, resultando em um ácido galacturônico como produto da reação principal. Enquanto as endo-poligalacturonases (E.C. 3.2.1.15) podem catalisar o rompimento aleatório dessa ligação (KONNO; YAMASAKI; KATOH, 1983; ALKORTA et al., 1998), como ilustra a Figura 2.

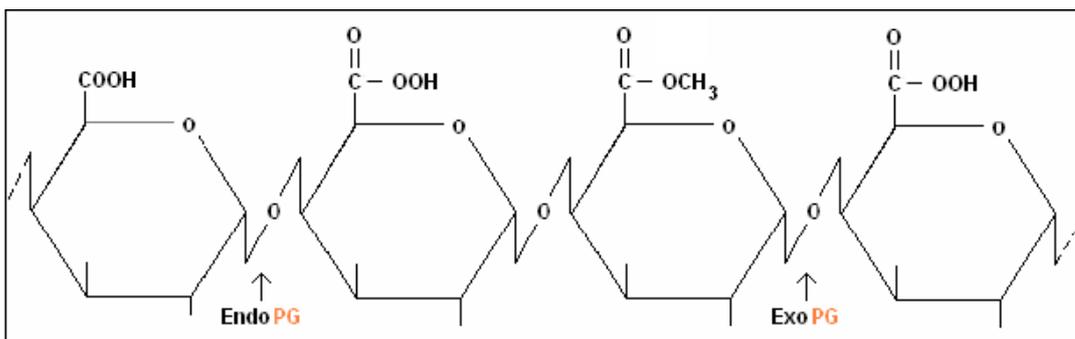


Figura 2. Representação das Posições de ataque das exo e endo-poligalacturonase na molécula de pectina (Gava, 1998).

A poligalacturonase (PG) é uma hidrolase, despolimerizante caracterizada como a maior enzima com função hidrolítica (ELEGADO & FUJIO, 1993). PGs são produzidas por fungos, bactérias, nematóides e insetos (DE LORENZO & FERRARI, 2002; GIRARD & JOUANIN, 1999; JAUBERT, 2002).

Preparações comerciais de poligalacturonases são utilizadas usualmente por indústrias de alimentos, sendo comumente produzidas a partir de *Aspergillus niger* ou *Kluyveromyces marxianus* (ZHENG & SHETTY, 2000).

O primeiro autor a descrever a produção de poligalacturonase por fungos foi Luh and Phaff em 1951, utilizando *Saccharomyces fragilis* (BLANCO; SIEIRO; VILLA, 1999). A partir de Luh and Phaff a busca por diferentes micro-organismos com potencial (estrutural-estabilidade) de produção de poligalacturonases, tem despertado interesses industriais (TARI et al., 2008). Nos últimos anos ocorreu um aumento significativo nas buscas por micro-organismos produtores de poligalacturonases provenientes de resíduos de processos

alimentícios (HART et al., 1991). Diversos trabalhos surgiram com novas opções de micro-organismos para a produção da PG, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Lista de micro-organismos utilizados para produção de poligalacturonase (PG) e suas respectivas referências

<b>Micro-organismos</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus awamori</i>	Nagai et al. (2000)
<i>Aspergillus japonicus</i>	Hasunuma; Fukusaki; Kobayashi (2003)
<i>Aspergillus sojae</i>	Tari et al. (2008)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Manachini; Parini; Fortina (1988)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Singh; Plattner; Diekmann (1999)
<i>Bacillus sp.</i>	Horikoshi (1990); Kapoor et al. (2000)
<i>Cryptococcus albidus</i> var. <i>albidus</i>	Federici (1985)
<i>Fabospora macedoniensis</i>	Egorov et al. (1983)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp.	Pietro & Roncero (1996)
<i>Geotrichum lactis</i>	Pardo; Lapenìa; Gacto (1991)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Sakai & Takaoka (1984)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Schwan & Rose (1994); Barnby; Morpeth; Pyle (1990); Almeida et al. (2003)
<i>Lentinus edodes</i>	Zheng & Shetty (2000)
<i>Mucor flavus</i>	Margo et al. (1994)
<i>Mucor pusilus</i>	Al-Obaidi; Aziz; Al-Bakir (1987)
<i>Neurospora rassa</i>	Polizeli; Jorge; Terenzi (1991)
<i>Penicillium frequentans</i>	Borin; Said; Fonseca (1996)
<i>Penicillium frequentans</i>	Favey et al. (1992)
<i>Penicillium griseoroseum</i>	Minussi et al. (1998)
<i>Rhizoctonia solani</i>	Marcus et al. (1986)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Manachini; Fortina; Parini (1987)
<i>Rhodotorula sp.</i>	Vaughn et al. (1969)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bell & Etchells (1956); Blanco ; Sieiro ; Villa

<i>continuação da Tabela 2...</i>	(1999); Macdonald & Evans (1996)
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Astapovich & Ryabaya (1997); Takao et al. (2001)
<i>Sclerotinia borealis</i>	Takao et al. (2000)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Koboyashi et al. (1999)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	Channe & Shewal (1995)
<i>Stereum purpureum</i>	Singh; Ramakrishna; Rao (1999)
<i>Thermococcus aurantiacus</i>	Takao et al. (2001)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Kashyap et al. (2000)

### 2.1.2 *Penicillium* sp.

Na natureza o *Penicillium* é um fungo versátil, oportunista e saprofítico, sendo considerado patógeno que causa deteriorização no pós-colheita de frutas e vegetais. Se algumas espécies são patógenos, por outro lado, outras espécies do micro-organismo são utilizadas pelas indústrias de alimentos e indústrias farmacêuticas (LEISTNER, 1990). Em particular o *Penicillium* é conhecido pela produção do antibiótico penicilina, originalmente produzido pelo *P. notatum* e descoberto por Fleming em 1928 (SMITH; LILLY; FOX, 1990). Na indústria de alimentos o *Penicillium* é reconhecido mundialmente na produção de queijos Roquefort (*P. roqueforti*) e Camembert (*P. camembertii*) (LEISTNER, 1990).

O gênero *Penicillium* tem sido utilizado como organismo modelo em diversas pesquisas, demonstrando suas diversas aplicações, podendo ser utilizado no micoparasitismo, biocontrole, secreção de metabólitos secundários, fontes de novos fármacos, fontes de enzimas de interesse industrial, dentre outras aplicações (GE et al., 2008; KWON et al., 2002; LARSEN et al., 2007; TAKAHASHI & LUCAS, 2008).

Este gênero de fungo compreende mais de 200 espécies descritas, sendo muitas comuns no solo, bem como contaminantes de origem alimentar ou de ingredientes alimentares utilizados na preparação de queijos e salsichas (PITT, 2000).

A cepa de *Penicillium* espécie *brasilianum* foi nomeada e caracterizada por Batista em 1957, devido às características morfológicas da colônia (FUJITA; MAKISHIMA; HAYASHI, 2002).

Vários metabólitos ativos foram isolados a partir desta espécie (SCHÜRMAN; SALLUM; TAKAHASHI, 2010) dentre eles um novo componente com atividade convulsivante foi denominado brasilamides: A, B, C, D e E (FILL et al., 2009).

Alguns trabalhos têm surgido utilizando esta espécie para a produção de enzimas como xilanase, feruloil esterase e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (PANAGIOTOU; OLAVARRIA; OLSSON, 2007); celulasas (JORGENSEN, 2003). O presente estudo visou utilizar o *Penicillium brasilianum* para a produção da PG.

### **2.1.3 Aplicações industriais das pectinases**

As enzimas, de um modo geral, são amplamente utilizadas nos processos industriais, em razão da sua especificidade e do seu potencial catalítico. Entretanto, uma enzima torna-se comercialmente interessante somente se houver demanda ou possuir propriedades que atendam aos requerimentos técnicos e econômicos do processo em escala industrial (BRAVO et al., 2000).

Pectinases de origem microbiana apresentam grande interesse comercial por sua vasta aplicação na indústria de alimentos, principalmente no processamento de frutas e vegetais (BLANCO; SIEIRO; VILLA, 1999).

A aplicação comercial das pectinases iniciou em 1930 na preparação de vinhos e sucos de frutas, mas somente a partir de 1960, quando os estudos de natureza química dos tecidos vegetais se tornaram mais aparentes, é que os cientistas começaram a utilizar as enzimas mais eficientemente (KASHYAP et al., 2000). Foi estimado que em 2005 a indústria de enzimas vendeu US\$ 1,7 a 2 bilhões (GODFREY & WEST, 1996), sendo a Novozyme (Dinamarca), Novartis (Suíça), Roche (Alemanha) e Biocon (Índia) as empresas com maior importância comercial na produção de pectinases (GUMMADI & PANDA, 2003).

As pectinases apresentam diversas aplicações biotecnológicas, dentre elas, filtração e clarificação de sucos de frutas (BRAWMAN, 1981); tratamento preliminar para produção de vinhos (REVILLA & GANZALEZ SAN-JOSE, 2003); tratamento de tecidos vegetais (BOHDZIEWIEZ & BODZEK, 1994; CHARLEY, 1969); fermentação de café e chá (CARR, 1985); extração de óleos (SCOTT, 1978); nutrição animal (HOONDAL, 2000); enriquecimento protéico de alimentos infantis (LANG & DÖRNENBURG, 2000) e mais recentemente o uso pelas indústrias têxteis para degomagem das fibras, tratamento de água residual e também em indústrias de papéis e celulose (KASHYAP et al., 2001).

Para a maioria dos usos industriais a PG obtida de fungos tem demonstrado melhor aplicação devido a sua alta atividade enzimática em faixas de pH baixos, adequada a aplicação em processamentos de frutas e vegetais (DZIEZAK, 1991).

## 2.2 IMOBILIZAÇÃO

As enzimas estão sujeitas a inativação quando estocadas ou durante o seu uso por acometimento de fatores químicos, físicos ou biológicos. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da intervenção com o

solvente, meio no qual é realizada a reação, pois o mesmo poderia provocar inativação, impossibilitando a catálise da reação, para isso, a técnica de imobilização é utilizada para fornecer uma maior estabilidade as enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (VILLENEUVE et al., 2000).

A imobilização enzimática é definida como o processo pelo qual o movimento das enzimas permaneça com espaço parcial ou totalmente restringido, dando lugar a uma enzima insolúvel em água. As enzimas imobilizadas são enzimas unidas, insolúveis e ligadas a uma matriz. As imobilizações catalíticas não são exclusivas a enzimas, sendo também utilizadas por catalisadores químicos (WISEMAN, 1991).

O principal objetivo da imobilização enzimática é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente a enzima imobilizada deverá exibir uma capacidade catalítica superior, embora a imobilização possa inibir ou aumentar a atividade e estabilidade da enzima em alguns casos. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

O aumento da atividade enzimática geralmente ocorre, pois a enzima quando imobilizada fica protegida pelo suporte frente às trocas de pH, temperatura, força iônica, forças de cisalhamento, interface ar-líquido entre outras variações do meio solvente em que se encontra (WISEMAN, 1991).

A imobilização pode ocorrer através de adsorção ou ligação em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulamento através de membrana polimérica (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A Figura 3 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas.

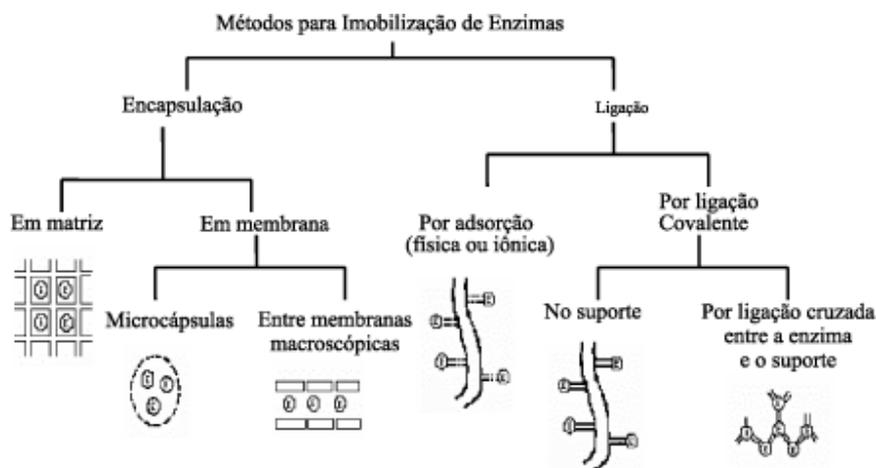


Figura 3. Métodos para imobilização de enzimas (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A imobilização de enzimas realizada em suportes sólidos faz com que as moléculas da enzima aumentem sua catálise e ainda facilite o reuso por mais tempo devido a sua fácil separação com o meio da reação (LEE et al., 2009).

### 2.2.1 Encapsulamento

A imobilização de um biocatalisador via inclusão, ou microencapsulação, consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. Neste sistema cria-se uma cela artificial que fica delimitada por uma membrana porosa. As enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, por serem moléculas grandes, enquanto que pequenas moléculas, como substratos e produtos conseguem se difundir. As vantagens da utilização desta técnica é que a enzima não interage

quimicamente com o polímero evitando a desnaturação enzimática (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A utilização de encapsulamento de tintas, drogas e outros compostos químicos já são conhecidos há mais tempo. Somente a partir dos anos 60 por Chang, 1964 que começou a aplicação de encapsulamento como técnica de imobilização de enzimas, a partir de então se tem imobilizado por encapsulamento um grande número de enzimas, usando distintos materiais e métodos de preparação das microcápsulas (WISEMAN, 1991).

O uso de agentes geleificantes naturais, como gelatina, agarose e k-carragenas estão sendo bastante utilizados na imobilização (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Mais comumente tem-se utilizado para a encapsulação a união de dois ou mais polímeros (HERTZBERG; KVITTINGEN; ANTHOSEN, 1992). O alginato, de longe, é o polímero mais utilizado em imobilizações e microencapsulamentos (LIANG; LI; YANG, 2000).

O suporte realizado pelo alginato geralmente ocorre pelas trocas do grupo carboxila do ácido  $\alpha$ -L-gulurônico com uma solução catiônica como cloreto de cálcio, cloreto bário ou poli(L-lisina) (DRAGET; SKAK-BRAEK; SMIDSRÖD, 1997; SMIDSRÖD & SKAK-BRAEK, 1990). A inter-relação entre o alginato e o cálcio explica a importância do uso de soluções contendo cálcio quando utilizado alginato como suporte da imobilização (TAQIEDDIN & AMIJI, 2004).

Li et al. (2007) imobilizaram pectinases utilizando alginato como suporte e glutaraldeído como agente reticulante para facilitar a imobilização da enzima e para evitar a dessorção da mesma, combinação esta que rendeu uma atividade residual considerável de 66 %.

### 2.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme apresentado no decorrer deste capítulo, não foram encontrados relatos na literatura a respeito da imobilização da enzima poligalacturonase (PG) de *Penicillium brasilianum*.

Neste contexto, o presente trabalho vem suprir a lacuna encontrada na literatura, abordando de forma ampla o efeito de parâmetros de imobilização, bem como a caracterização parcial da enzima imobilizada.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 PRODUÇÃO DA POLIGALACTURONASE (PG)

A cepa do fungo filamentoso *Penicillium brasilianum* utilizado neste estudo foi cultivada em Potato Dextrose Ágar (PDA) durante 7 dias a 30°C. Em seguida, a coleta dos esporos foi realizada adicionando-se 20 mL de solução aquosa de Tween 80 (0,1 % v/v), e pérolas de vidro estéreis adicionadas ao frasco, para uma melhor remoção dos esporos. A suspensão resultante foi armazenada a 4°C até sua utilização, o que não ultrapassava um tempo máximo de 15 dias. Para contagem dos esporos, 1 mL da suspensão, retirada assepticamente, foi diluída de 10 a 10<sup>3</sup> vezes em solução aquosa estéril de Tween 80 (0,1 % v/v). A suspensão resultante foi transferida para uma câmara de Neubauer para contagem dos esporos (FREIRE, 1996), sendo estas fixadas 5x10<sup>6</sup> esporos/mL (ZENI, 2009).

A bioprodução de PG foi realizada em biorreator de bancada (BIOSTAT® B-B. Braun Biotech International GmbH), segundo metodologia descrita por Zeni (2009), empregando-se meio composto por 32 g/L de pectina cítrica, 10 g/L de extrato de levedura e 0,05 g/L de sulfato de magnésio, agitação de 180 rpm, aeração de 1,5 vvm, pH inicial de 4,5, 30°C, tempo de produção de 72 horas. O pH inicial de todos os ensaios foi ajustado a 4,5 com a adição de soluções de HCl (2 M) ou NaOH (2 M). O meio foi autoclavado a 1 atm por 15 min. As amostras foram coletadas após 72 horas de bioprodução, em seguida filtradas e imobilizadas.

### 3.2 IMOBILIZAÇÃO DA POLIGALACTURONASE (PG)

A imobilização foi realizada por encapsulamento em suporte sólido por adsorção. O encapsulamento foi baseado na geleificação de alginato de sódio (copolímero linear dos ácidos D-manurônico e L-gulurônico da Vetec® e Cinética®) e glutaraldeído (Vetec®) para enrijecimento do gel, carvão ativado (Alpha LA 810 - Alphacarbo®) como suporte sólido orgânico, sacarose, água e extrato enzimático de poligalacturonase. A utilização da combinação alginato de sódio e glutaraldeído como suporte e agente reticulante foi baseada em estudo de Li et al. (2007).

Para a imobilização em forma de microesferas, o gel contendo o extrato enzimático foi gotejado em uma solução gelada de tampão acetato e cloreto de sódio 0,05 M (1:1), permanecendo sob agitação constante durante o gotejamento, como pode ser observado na Figura 4.

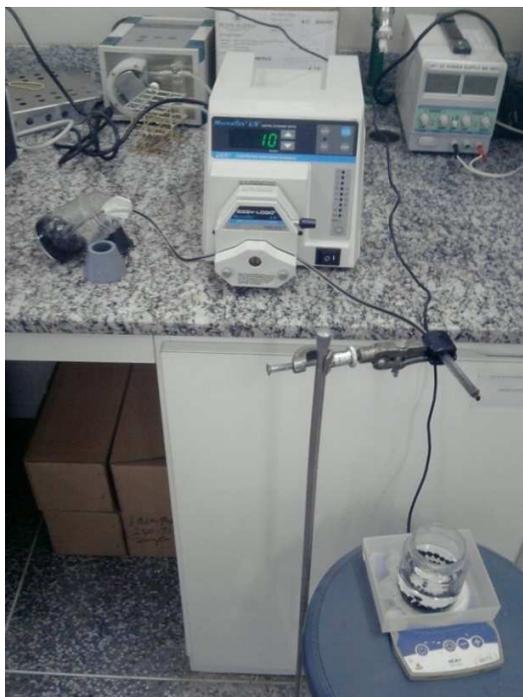


Figura 4. Formação de microesferas da enzima imobilizada.

Após a fixação total da enzima ao suporte, o imobilizado foi lavado com 100 mL de água destilada e 100 mL de tampão acetato. A enzima imobilizada foi conservada até o momento da medida de atividade em solução tampão acetato e cloreto de sódio 0,2 M, na proporção 1:1.

Para estudar os efeitos das condições de imobilização da poligalacturonase foi utilizado um planejamento fatorial completo  $2^3$  composto por 8 ensaios mais 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios. As quantidades de sacarose e extrato enzimático foram fixados em 6,5 g/L e 3 mL/L, respectivamente, baseada em trabalhos prévios realizados com outras enzimas. No entanto as quantidades de alginato de sódio, glutaraldeído e carvão ativado variaram conforme os níveis descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo  $2^3$ .

Variáveis Independentes*	Códigos	Níveis		
		-1	0	+1
Alginato de Sódio (% m/v)	X <sub>1</sub>	2,0	5,0	8,0
Glutaraldeído (% v/v)	X <sub>2</sub>	5,0	10,0	15,0
Carvão Ativado (% m/v)	X <sub>3</sub>	3,0	5,0	7,0

Variáveis Independentes Fixas: sacarose 6,5 g/L; extrato enzimático 3 mL/L.

A partir dos resultados obtidos no planejamento  $2^3$  realizou-se um planejamento fatorial completo  $2^2$ , incluindo 4 pontos axiais e 3 repetições do ponto central, deslocando os níveis das variáveis conforme o tratamento estatístico realizado no primeiro delineamento experimental, conforme apresenta a Tabela 4. Os valores de sacarose, extrato

enzimático e carvão ativado foram fixados em 6,5 g/L, 3 mL/L e 3 % (m/v), respectivamente.

Tabela 4. Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial completo  $2^2$ .

Variáveis	Códigos	Níveis				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
Independentes*		-1,41	-1	0	+1	+1,41
Alginato (% m/v)	X <sub>1</sub>	0,77	2,0	5,0	8,0	9,23
Glutaraldeído (% v/v)	X <sub>2</sub>	7,95	10,0	15,0	20,0	22,05

Variáveis Independentes Fixas: sacarose 6,5 g/L; extrato enzimático 3 mL/L e carvão ativado 3 % (m/v).

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA POLIGALACTURONASE IMOBILIZADA

O estudo da enzima imobilizada foi realizado em termos de temperatura ótima, termoestabilidade, pH ótimo, e estabilidade de pH. A condição otimizada da imobilização da enzima foi avaliada através da atividade enzimática em diferentes temperaturas e valores de pH. As faixas de pH e temperatura avaliadas foram determinadas baseadas em estudos prévios (ZENI, 2009).

#### 3.3.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática

Para o estudo do efeito da temperatura e pH na atividade enzimática realizou-se um delineamento composto central rotacional  $2^2$  (DCCR), totalizando 11 experimentos, ( $2^2$  ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes). O tempo total de reação foi de 6 minutos e as faixas de pH e temperatura estudadas são apresentadas na Tabela 5. Os resultados foram

analisados usando o software Statistica® 7.0 Statsoft Inc., determinando os valores ótimos destas variáveis para máxima atividade enzimática.

Tabela 5. Variáveis e níveis estudados no DCCR ( $2^2$ ), para otimização da atividade PG.

Variáveis Independentes / Níveis	-1,41	-1	0	1	1,41
pH	3,0	3,4	4,5	5,5	6,0
Temperatura (°C)	30,0	37,0	55,0	73,0	80,0

### 3.3.2 Efeito do pH na estabilidade da enzima imobilizada

A estabilidade da poligalacturonase foi testada incubando a enzima imobilizada em tampão acetato de sódio 0.1 M nas faixas de pH 4.0; 5.0; 7.0 e 9.0 a uma temperatura de 40°C. O pH foi ajustado com diferentes tampões: biftalato de potássio/HCl (0,1 M) para o pH 4,0, fosfato de sódio (0,1 M) para os pHs 5,0 e 7,0, e Solução de Kolthoff (0,1 M) para o pH 9,0. As amostras foram retiradas em determinados intervalos de tempo medindo-se a atividade enzimática pelo método DNS, como descrito no Item 3.3.4.

### 3.3.3 Efeito da estabilidade da enzima imobilizada em baixa e altas temperaturas

O efeito da estabilidade da poligalacturonase nas diversas temperaturas foi realizado conservando as enzimas imobilizadas em solução tampão acetato e cloreto de sódio 0,2 M, na proporção 1:1. As amostras foram armazenadas nas temperaturas de 4; 25; 35; 45 e 55°C e em determinados intervalos de tempo realizou-se as medidas de atividade a fim de acompanhar a estabilidade da enzima. A atividade da poligalacturonase foi determinada conforme o Item 3.3.4.

### 3.3.4 Determinação da atividade da poligalacturonase (PG)

A atividade da poligalacturonase (PG) foi determinada pela medida da liberação de grupos redutores usando-se o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), proposto inicialmente por Miller (1959), com algumas modificações.

A solução de DNS foi preparada dissolvendo-se, a quente, 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico e 19,8 g de NaOH em 1416,0 mL de água destilada. A seguir foram adicionados 7,6 mL de fenol fundido a 50°C e 8,3 g de metabissulfito de sódio.

Inicialmente, preparou-se 1000 µL de substrato (solução 0,5 % de pectina cítrica (Sigma) em tampão acetato pH 4,5) e incubou-se a 40 °C por 15 minutos para estabilização de temperatura. A seguir, 1 g de microesferas de enzima imobilizada foram adicionadas ao substrato e a reação incubada a 40 °C por 6 minutos. Logo, foi retirado 1500 µL da reação do substrato com as enzimas imobilizadas, adicionou-se 1000 µL de solução de DNS, a mistura foi mantida em ebulição por 8 minutos para formação de cor, resfriada em banho de gelo e adicionados 8,0 mL de solução 50 mM de tartarato duplo de sódio-potássio para estabilização de cor.

A absorbância foi medida em espectrofotômetro Beckman Coutler, modelo DU640, a 540 nm, contra o branco. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácido galacturônico por minuto ( $U = \mu\text{mol}/\text{min}$ ) segundo uma curva padrão estabelecida com ácido  $\alpha$ -D-galacturônico (Fluka Chemica, massa molecular 212,16) como açúcar redutor. A atividade da poligalacturonase foi expressa em unidade de atividade por mL (U/mL). As análises foram realizadas em triplicata.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão apresentados os resultados referentes aos planejamentos da imobilização da poligalacturonase (PG) produzida a partir de *Penicillium brasilianum* em biorreator, bem como sua caracterização parcial e avaliação da estabilidade.

### 4.1 IMOBILIZAÇÃO DA POLIGALACTURONASE

Utilizando a ferramenta de planejamento experimental foi possível investigar a influência das variáveis em um processo e a forma de interação entre estas variáveis, bem como obter o valor das variáveis que otimizam os resultados.

A Tabela 6 apresenta a matriz do planejamento  $2^3$  com os valores codificados (reais) das variáveis independentes do suporte da enzima (alginato de sódio, glutaraldeído e carvão ativado) estudadas e as respostas em atividade da poligalacturonase (PG). Nesta etapa, a concentração de água foi fixada em 10 mL/L, a concentração da solução enzimática em 3 mL/L e a sacarose em 50 % (m/v) em relação ao total de água e solução enzimática para todos os experimentos, correspondendo a 6,5g/L, conforme Risso et al. (2010). A máxima atividade da poligalacturonase (5,07 U/mL) foi obtida no ensaio 4, no qual utilizou-se as maiores concentrações de alginato de sódio (8 %) e glutaraldeído (15 %), e menor concentração de carvão ativado (3 %).

Tabela 6. Matriz do planejamento fatorial completo  $2^3$  (valores reais e codificados) e resposta em atividade da poligalacturonase.

Ensaio	Variáveis Independentes*			PG (U/mL)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
1	-1 (2)	-1 (5)	-1 (3)	0,89
2	1 (8)	-1 (5)	-1 (3)	1,38
3	-1 (2)	1 (15)	-1 (3)	1,13
4	1 (8)	1 (15)	-1 (3)	5,07
5	-1 (2)	-1 (5)	1 (7)	0,81
6	1 (8)	-1 (5)	1 (7)	1,40
7	-1 (2)	1 (15)	1 (7)	1,27
8	1 (8)	1 (15)	1 (7)	3,28
9	0 (5)	0 (10)	0 (5)	1,69
10	0 (5)	0 (10)	0 (5)	1,46
11	0 (5)	0 (10)	0 (5)	1,77

\*X<sub>1</sub>= Alginato de Sódio (%), X<sub>2</sub>= Glutaraldeído (%), X<sub>3</sub>= Carvão ativado (%). Variáveis independentes fixas: extrato enzimático (3 mL/L), sacarose (6,5 g).

A Figura 5 apresenta o gráfico de Pareto com os efeitos estimados das variáveis estudadas. Verifica-se que as variáveis independentes concentração de alginato de sódio e glutaraldeído apresentaram efeito positivo significativo no nível de confiança de 95 %, o que significa que quando a concentração e/ou faixa desta variável aumentar do nível -1 para o +1 possivelmente ocasionará um aumento na atividade enzimática. Entretanto, a variável carvão ativado não apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ).

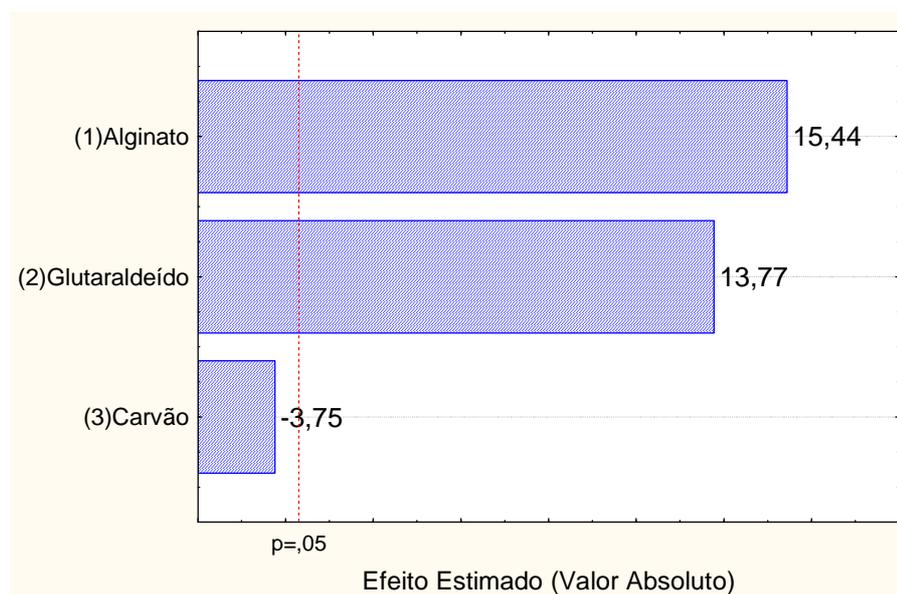


Figura 5. Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no planejamento  $2^3$ , para a atividade da poligalacturonase (U/mL) do material imobilizado.

Com base nos resultados observados foi realizado um planejamento fatorial completo  $2^2$ , deslocando os níveis de glutaraldeído para valores superiores, a fim de melhorar a atividade da poligalacturonase. Em relação ao alginato de sódio, a faixa de estudo foi mantida, uma vez que seu aumento acarretaria na impossibilidade de formação das esferas de imobilização, devido à alta viscosidade do sistema. A Tabela 7 apresenta a matriz do planejamento fatorial  $2^2$  completo (com 4 pontos axiais) e as respostas em atividade enzimática (PG).

A máxima atividade de PG foi encontrada nos ensaios do ponto central ( $\sim 17,28$ U/mL), correspondendo à concentração de 5 % de alginato de sódio e 15 % de glutaraldeído na composição do suporte da imobilização.

Tabela 7. Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  completo (valores codificados e reais) e resposta em atividade da poligalacturonase.

Ensaio	Variáveis Independentes*		PG (U/mL)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	
1	-1 (2)	-1 (10)	5,13
2	1 (8)	-1 (10)	16,09
3	-1 (2)	1 (20)	9,26
4	1 (8)	1 (20)	6,23
6	-1,41 (0,77)	0 (15)	12,11
7	+1,41 (9,23)	0 (15)	12,04
8	0 (5)	-1,41 (7,95)	8,13
9	0 (5)	+1,41 (22,05)	7,46
10	0 (5)	0 (15)	17,00
11	0 (5)	0 (15)	17,15
12	0 (5)	0 (15)	17,70

\*X<sub>1</sub>= Alginato (%), X<sub>2</sub>= Glutaraldeído (%). Variáveis independentes fixas: carvão ativado 3%, extrato enzimático 3 mL/L e sacarose 6,5 g/L.

A Tabela 8 apresenta os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de p e t, para a atividade da poligalacturonase em função das variáveis avaliadas. As concentrações de alginato de sódio e glutaraldeído demonstraram uma influência positiva ( $p < 0,05$ ) sobre a atividade da poligalacturonase.

Tabela 8. Coeficientes de regressão e erro padrão, valores de p e t do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> para atividade de poligalacturonase

	Coeficientes de Regressão	Erro padrão	t(2)	P
Média*	17,28	0,90	19,19	<0,001
(1)Alginato (L)	0,98	0,55	1,77	0,134
Alginato (Q)*	-2,80	0,65	-4,25	0,008
(2)Glutaraldeído (L)	-0,83	0,55	-1,51	0,189
Glutaraldeído (Q)*	-4,95	0,65	-7,51	0,001
1L.2L*	-3,49	0,77	-4,48	0,006

\*Fatores estatisticamente significativos (p<0,05)

A Equação 1 apresenta o modelo codificado de segunda ordem, que descreve a atividade da poligalacturonase em função das variáveis analisadas (alginato de sódio e glutaraldeído), dentro das faixas estudadas. O modelo foi validado pela análise de variância (Tabela 9), onde se obteve um coeficiente de correlação de 0,97 e o F calculado de 3,43 vezes maior que o valor tabelado. O coeficiente de correlação quantifica a qualidade do ajustamento, pois fornece uma medida da proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas, variando de 0 a 100 % (RODRIGUES & IEMMA, 2005). O valor de F apresenta a razão entre o F calculado e o F tabelado, ou seja, sempre que esta relação for maior que 1, a regressão é estatisticamente significativa, havendo relação entre as variáveis independentes e dependentes. Para que uma regressão

seja não apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor da razão deve ser no mínimo maior que 4 (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

Tabela 9. Análise de variância das condições de imobilização da PG frente à atividade enzimática do planejamento completo  $2^2$ , com 4 pontos axiais.

<b>Fontes de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Graus de liberdade</b>	<b>Quadrados médios</b>	<b>F Calculado</b>
<b>Regressão</b>	210,90	5	42,18	17,34
<b>Resíduo</b>	12,16	5	2,43	
<b>Total</b>	223,07	10		

Coefficiente de Correlação  $R=0,97$ ,  $F_{tab,95\%}=5,05$

Equação 1:

$$PG: 17,28 + 0,98X_1 - 2,80X_1^2 - 0,83X_2 - 4,95X_2^2 - 3,49X_1X_2$$

Onde: PG = Atividade de PG (U/mL);  $X_1$ = Alginato de sódio (g/L);  $X_2$ = Glutaraldeído (g/L).

A máxima produção de PG (17,28 U/mL) ficou localizada na região próxima aos pontos centrais (5 % de alginato de sódio e 15 % de glutaraldeído), os quais caracterizam a otimização da imobilização da enzima, dentro da faixa estudada.

Existem poucos trabalhos na literatura que relatam os efeitos dos agentes imobilizantes na imobilização de poligalacturonase. A importância da utilização de alginato de sódio como suporte é comprovada por Taqieddin e Amiji (2004), que analisando o uso de alginato e quitosana ilustraram um novo método para preparar microcápsulas, visando à

utilização na imobilização de enzimas, células e micro-organismos, de tal forma que o agente biológico fica protegido no núcleo pelo alginato e as propriedades de transporte são realizadas pela quitosana, na parte externa.

A ativação de suportes com glutaraldeído é uma das mais populares técnicas para imobilizar enzimas. Em alguns casos o glutaraldeído permite a melhora na estabilidade enzimática, além de ser utilizado para reticulações intermoleculares nas proteínas ou para modificar a adsorção de proteínas em suportes aminados (BETANCOR et al., 2006). Estudo realizado por Song et al., (2010) avaliaram a utilização de pré-tratamento com lactose na imobilização de  $\beta$ -galactosidase em sílica gel com uso de glutaraldeído como ligante, foi observado que a utilização do pré-tratamento com lactose demonstrou maior estabilidade enzimática frente ao não tratamento prévio, o que confere um maior sucesso na aplicação industrial da enzima.

Spagna, Pifferi, Gilioli (1995), ao imobilizar pectinato liase em suporte inorgânico observaram que a utilização de glutaraldeído ativado com bentonita na presença de albumina, embora apresente uma baixa atividade à enzima permaneceu estável em temperatura e pH baixos, por um ótimo tempo, aproximadamente 650 horas.

A utilização do carvão ativado como suporte enzimático corrobora sua importância como mostra o artigo de Menoncin et al., (2009) ao analisar dois diferentes suportes hidrofóbicos para imobilização de lipase, observaram que a utilização de carvão ativado como suporte apresentou melhores resultados quando comparada a imobilização com resina polimérica.

Novos estudos tem demonstrado que a imobilização de enzimas em superfície sólida induzida por pressão foi considerada como método rápido, simples e eficiente, segundo

Kannoujia, Ali, Nahar (2009). Este método não gera calor durante a imobilização e pode ser aplicado em imobilizações de biomoléculas sensíveis a aumentos de temperatura.

Deve-se ressaltar, no entanto, que as comparações entre os dados experimentais nem sempre são consistentes, visto as variações de métodos de fermentação, extração das enzimas, quantificação e expressão das atividades enzimáticas.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA POLIGALACTURONASE

Os métodos de caracterização enzimática tornam-se muito importantes para verificar a aplicabilidade industrial das enzimas. Nesta avaliação torna-se possível avaliar a temperatura e pH ótimo, estabilidade térmica e estabilidade ao pH.

### 4.2.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática

O pH ótimo e a temperatura para atividade da PG foram determinados através da execução de um delineamento composto central rotacional  $2^2$ , totalizando 11 experimentos, ( $2^2$  ensaios com 2 pontos axiais para cada variável independente e 1 ponto central para cada variável independente repetido 3 vezes). A Tabela 10 apresenta a matriz em termos de atividade da poligalacturonase para efeito de pH e temperatura. Os maiores valores de atividade enzimática obtidos experimentalmente foram de 10,64 U/mL (experimento 9) seguida do experimento 2 (10,34 U/mL). Os resultados mostram que as melhores atividades enzimáticas foram obtidas em diferentes temperaturas (80 e 37°C, respectivamente), já em termos de pH, as atividades mais elevadas encontram-se nos ensaios onde os maiores valores de pH (4,5 e 5,5, respectivamente) foram aplicados.

Tabela 10. Matriz do delineamento composto central rotacional  $2^2$  (valores codificados e reais) e resposta em atividade da poligalacturonase.

Ensaio	Variáveis Independentes*		PG (U/mL)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	
1	-1 (3,4)	-1 (37)	0,31
2	1 (5,5)	-1 (37)	10,34
3	-1 (3,4)	1 (73)	3,00
4	1 (5,5)	1 (73)	8,68
6	-1,41 (3)	0 (55)	3,35
7	+1,41 (6)	0 (55)	7,97
8	0 (4,5)	-1,41 (30)	0,00
9	0 (4,5)	+1,41 (80)	10,64
10	0 (4,5)	0 (55)	9,50
11	0 (4,5)	0 (55)	9,30
12	0 (4,5)	0 (55)	9,23

\*X<sub>1</sub>= pH, X<sub>2</sub>= temperatura (°C).

Os resultados apresentados referente à atividade da PG foram tratados estatisticamente para a avaliação dos efeitos de cada variável independente sobre a resposta. A Figura 6 (Gráfico de Pareto) que apresenta a análise dos efeitos das variáveis estudadas na atividade enzimática, demonstra que apenas o pH apresentou efeito significativo ( $p < 0,05$ ), o que demonstra que apenas as variações de pH interferem significativamente no processo.

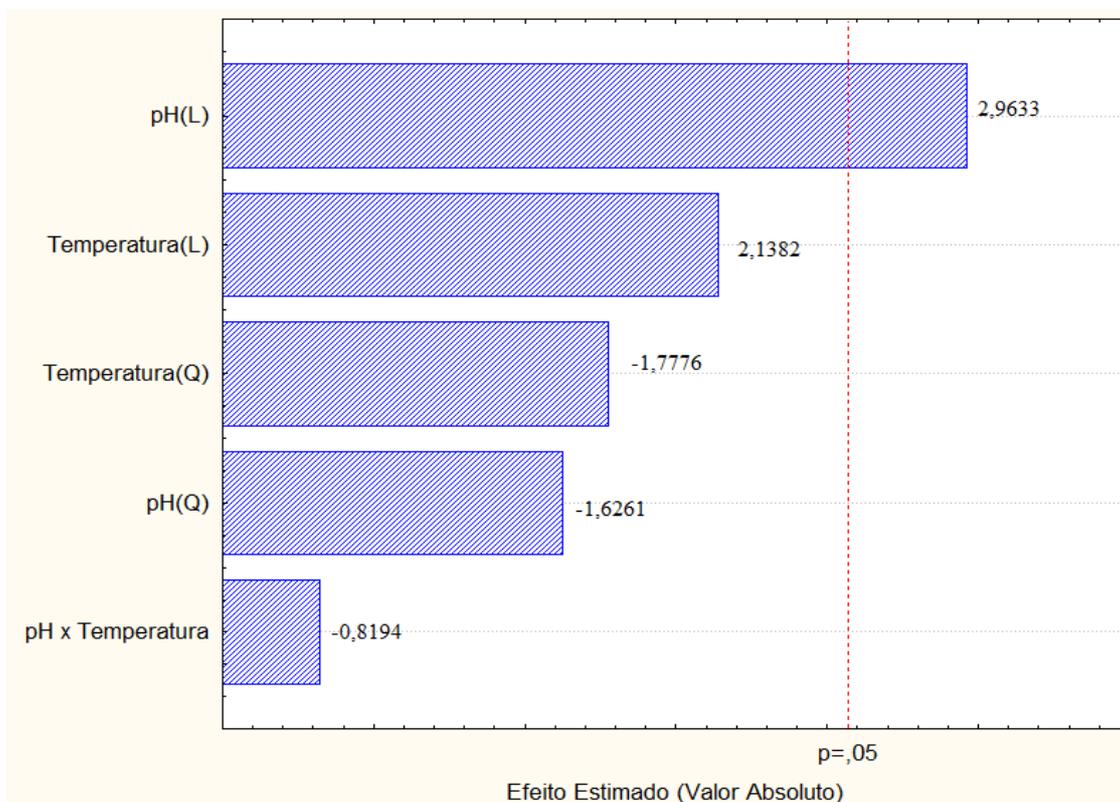


Figura 6. Gráfico de Pareto com o efeito estimado (valor absoluto) das variáveis testadas no DCCR, para a atividade da poligalacturonase (U/mL) do material imobilizado.

Na literatura disponível, observa-se que as temperaturas e pH ótimos da PG, variam em função da cepa utilizada, do extrato enzimático e/ou das condições de cultivo. Gomes et al. (2010) ao produzir PG por *Aspergillus niger* obteve máxima atividade (72,93 U/mL) em pH 5,5 a 37°C.

Kappor et al. (2000) ao produzir e caracterizar parcialmente PG a partir *Bacillus* sp. observou em pH 10,0 a máxima atividade e a enzima manteve mais de 86 % da atividade em uma faixa de pH 8,5 – 12,0 a 60°C. A temperatura ótima para a enzima PG no estudo de Grade et al. (2003) ficou entre 35 e 50°C e o pH entre 3,5 e 5,5. Quiroga et al. (2009) em

estudo com a enzima exo-poligalacturonase produzida por *Pycnoporus sanguineus* obteve pH ótimo de 4,8 e temperatura ótima na faixa de 50 e 60°C.

A atividade ótima da PG foi relatada em faixa próxima a pH 5 por Tari et al. (2008), pH 4 a 5,5 por Jayani et al. (2005) e Gummadi e Panda (2003). Em estudo de Jacob et al. (2008) com poligalacturonase purificada a atividade ótima foi exibida em pH 6,0 a 50°C.

No estudo de Cordeiro & Martins (2009) a atividade da PG aumentou com a elevação da temperatura, atingindo seu valor máximo a 70°C e pH em torno de 7,0. Contrário a essa temperatura, trabalho de Souza et al. (2010) a enzima PG foi completamente desativada quando incubada a temperatura acima de 70°C, durante 20 minutos.

Convém salientar que os estudos relatados acima referem-se todos a enzima em sua forma livre, não permitindo a comparação direta, visto que a enzima caracterizada no presente trabalho encontra-se imobilizada.

#### **4.2.2 Estabilidade da atividade da poligalacturonase (PG)**

O estudo da estabilidade é importante, pelo fato de permitir observar o comportamento da enzima e quanto de sua atividade inicial é mantida ao longo do armazenamento. O estudo cinético foi realizado a partir da imobilização da enzima sob condição experimental otimizada, tendo como objetivo avaliar a estabilidade da atividade da poligalacturonase em função do tempo em diversos pHs e temperaturas.

#### 4.2.2.1 Influência do pH no estudo da estabilidade para a enzima poligalacturonase

Os resultados apresentados na Tabela 11 e na Figura 7 referem-se ao comportamento da PG imobilizada em diferentes pHs. A análise dos resultados demonstram que nos diferentes pHs avaliados (4,0; 5,0 e 9,0), comportamentos similares foram obtidos, os quais apresentaram depois de 67 horas de reação, redução de 73,8; 73,4 e 73,3 % de atividade, respectivamente. Porém, em pH 7,0 houve uma desestabilização na imobilização, degradando as microesferas já na primeira hora de teste, impossibilitando as demais medidas de atividade.

Tabela 11. Valores das atividades enzimáticas versus os pHs estudados em função do tempo.

<b>Tempo</b>	<b>pH</b>				
	<b>(h)</b>	<b>4,0</b>	<b>5,0</b>	<b>7,0</b>	<b>9,0</b>
<b>0</b>		38,26	38,34	38,28	38,35
<b>1</b>		20,44	20,14	-	18,85
<b>5</b>		18,09	20,47	-	19,89
<b>9</b>		17,98	17,97	-	17,58
<b>27</b>		16,46	16,53	-	17,11
<b>43</b>		19,37	19,06	-	19,70
<b>59</b>		18,47	18,54	-	17,32
<b>67</b>		10,01	10,21	-	10,25

A estabilidade do pH para a enzima bruta foi recentemente reportada por Gomes et al. (2010), a PG produzida por *Aspergillus niger* apresentou estabilidade de 173 horas de

incubação em pH 5,0, estabilidade esta maior que a observada neste estudo.

A estabilidade da PG foi menor no estudo de Cordeiro e Martins (2009) que observaram estabilidade de apenas 2 horas em valores de pH entre 6,0 e 7,5. A baixa duração da estabilidade desta enzima bruta também foi relatada por Kapoor et al. (2000) a partir de PG produzida por *Bacillus* sp. a qual foi estável por 24 horas na faixa de pH de 7 a 12 retendo 80 % de sua atividade.

Conforme Souza et al. (2010) a PG presente do extrato bruto de *Aspergillus niger* demonstrou estabilidade entre o pH 3,5 e 5,5 sendo instável em pH acima de 6,5. Já em estudo de Martins et al. (2002) ao avaliar a PG produzida por *Thermoascus aurantiacus* o pH com maior estabilidade mantendo 85% de atividade foi de 7,0 a 8,0.

A PG imobilizada neste estudo demonstrou estabilidade em pH 4,0, pH 5,0 e pH 9,0 o que faz da imobilização um importante agente protetor possibilitando a aplicação industrial da enzima em produtos que requerem maior variação de pH.

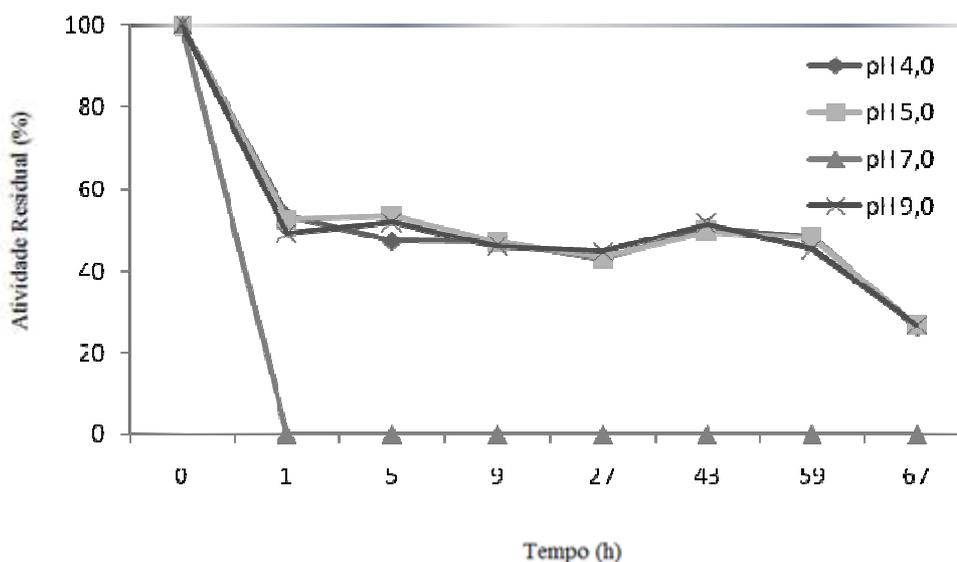


Figura 7. Influência do pH na estabilidade da poligalacturonase imobilizada.

#### 4.2.2.2 Estabilidade da enzima imobilizada em diferentes temperaturas

Os resultados obtidos do decaimento da atividade enzimática da poligalacturonase em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas, no intervalo de 4 a 55°C, estão apresentados nas Tabelas 12, 13, 14, 15 e 16.

Observando as faixas de temperaturas estudadas foi possível perceber que em todas as temperaturas avaliadas não houve comportamento distinto entre as diferentes temperaturas de armazenamento em teste. As cinco formas de armazenamento, apresentaram oscilações, ou seja em determinados períodos diminuição da atividade e, em outros, acréscimo. O comportamento foi semelhante em todas as temperaturas de armazenamento, obtendo queda de mais de 50 % da atividade enzimática em 67 horas de teste para as incubações a 4, 25, 35 e 55°C. No entanto, a enzima armazenada há 45°C o decréscimo já foi observado nas 59 horas.

O tempo de estabilidade da PG imobilizada deste estudo foi maior que em trabalho realizado por Kapoor et al. (2000) que demonstraram queda de 50 % da atividade da poligalacturonase não imobilizada e incubada a 60°C, 70°C e 80°C de apenas 120, 118 e 20 minutos, respectivamente. Já em estudo de Gomes et al. (2010) a PG não imobilizada produzida de *Aspergillus niger* obteve longa estabilidade em 55°C chegando a quase 400 horas.

Tabela 12. Perfis de atividade da PG imobilizada a temperatura de 4°C.

<b>Tempo (h)</b>	<b>A/A<sub>0</sub></b>	<b>Atividade Relativa (%)</b>
<b>0</b>	1,00	100
<b>1</b>	0,80	80,1
<b>5</b>	1,70	170,6
<b>9</b>	1,31	131,7
<b>19</b>	1,28	128,0
<b>27</b>	0,97	97,3
<b>43</b>	0,88	88,2
<b>59</b>	0,69	69,4
<b>67</b>	0,39	39,1

Tabela 13. Perfis de atividade da PG imobilizada a temperatura de 25°C.

<b>Tempo (h)</b>	<b>A/A<sub>0</sub></b>	<b>Atividade Relativa</b>
<b>0</b>	1,00	100
<b>1</b>	0,81	81,0
<b>5</b>	1,45	145,0
<b>9</b>	1,33	133,3
<b>19</b>	1,21	121,5
<b>27</b>	0,91	91,1
<b>43</b>	1,19	119,0
<b>59</b>	1,17	117,1
<b>67</b>	0,30	30,2

Tabela 14. Perfis de atividade da PG imobilizada a temperatura de 35°C.

<b>Tempo (h)</b>	<b>A/A<sub>0</sub></b>	<b>Atividade Relativa</b>
<b>0</b>	1,00	100
<b>1</b>	0,80	80,1
<b>5</b>	1,43	143,2
<b>9</b>	0,92	92,1
<b>19</b>	1,27	126,7
<b>27</b>	1,15	115,4
<b>43</b>	1,19	119,1
<b>59</b>	1,65	165,5
<b>67</b>	0,45	45,3

Tabela 15. Perfis de atividade da PG imobilizada a temperatura de 45°C.

<b>Tempo (h)</b>	<b>A/A<sub>0</sub></b>	<b>Atividade Relativa</b>
<b>0</b>	1,00	100
<b>1</b>	0,51	51,2
<b>5</b>	0,54	54,0
<b>9</b>	0,51	51,1
<b>19</b>	0,51	51,3
<b>27</b>	0,51	51,0
<b>43</b>	0,50	50,8
<b>59</b>	0,48	48,0
<b>67</b>	0,29	29,1

Tabela 16. Perfis de atividade da PG imobilizada a temperatura de 55°C.

<b>Tempo (h)</b>	<b>A/A<sub>0</sub></b>	<b>Atividade Relativa</b>
<b>0</b>	1,00	100
<b>1</b>	0,51	51,1
<b>5</b>	0,52	52,0
<b>9</b>	0,52	52,2
<b>19</b>	0,51	51,0
<b>27</b>	0,51	51,0
<b>43</b>	0,51	51,1
<b>59</b>	0,50	50,9
<b>67</b>	0,33	32,8

Os dados obtidos experimentalmente foram avaliados em termos de  $\ln A/A_0$  versus tempo e obtendo-se desta forma o valor de  $K_d$  (constante de desativação térmica) para cada temperatura, como mostra a Tabela 17. A expressão utilizada para determinar os valores de  $K_d$  foi:  $K_d$  (teórico) =  $K_{do} * \exp(-E_d/RT)$ , sendo  $T$  = temperatura em Kelvin.

Outro parâmetro imprescindível utilizado quando se avalia a estabilidade enzimática é o tempo de meia vida,  $t_{1/2}$ , que corresponde ao intervalo de tempo necessário, a uma dada temperatura para que a enzima tenha sua atividade reduzida a 50 % da atividade inicial. Os valores dos tempos de meia vida (horas) foram calculados de acordo com a equação  $t_{1/2} = -\ln 0,5/K_d$ , para cada temperatura estudada, sendo que a Tabela 17 apresenta os valores de meia vida experimental.

Tabela 17. Valores de Kd e tempos de meia vida estimados para enzima PG imobilizada.

<b>T (°C)</b>	<b>T(K)</b>	<b>Kd</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>
<b>25</b>	298,15	0,003	231,03
<b>35</b>	308,15	0,009	77,01
<b>45</b>	318,15	0,009	77,01
<b>55</b>	328,15	0,002	346,55

Zeni (2009) ao avaliar a constante de desativação térmica (Kd) e o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima PG produzida por *Penicillium brasilianum*, observaram que os maiores tempos de meia vida foram nas temperaturas de 55°C (693,10 horas), 25°C (346,55 horas), da mesma forma a enzima PG imobilizada neste estudo apresentou seus maiores tempos de meia vida a 55°C (346,55 horas) e 25°C (231,03 horas). Embora a imobilização não tenha provocado aumento no tempo de meia vida da enzima, as temperaturas que apresentaram maior tempo de meia vida foram exatamente às mesmas.

## 5 CONCLUSÃO

A máxima atividade de PG (17,28 U/mL) do extrato enzimático encapsulado foi obtida nas condições de imobilização de 5% (m/v) de alginato de sódio, 15% (v/v) de glutaraldeído, 3 % (m/v) de carvão ativado, 3 mL/L de extrato enzimático e 50 % (p/v) de sacarose em relação ao total de água e solução enzimática.

Avaliando a condição otimizada quanto a estabilidade em diversos pHs e temperaturas verificou-se que a enzima PG imobilizada apresentou os maiores tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ) a 55°C (346,55 horas) e 25°C (231,03 horas) e estabilidade em pH 4,0, pH 5,0 e pH 9,0 o que faz da imobilização um importante agente protetor possibilitando a aplicação industrial da enzima em produtos que requerem maior variação de pH.

## 6 SUGESTÕES

Realizar a imobilização de outras pectinases produzidas pelo micro-organismo *Penicillium brasilianum*.

Aplicar as enzimas imobilizadas em reações de interesse na indústria de alimentos.

Avaliar a possibilidade de reutilização da enzima imobilizada.

## 7 REFERÊNCIAS

AL-OBAIDI, Z.S.; AZIZ, G.M.; AL-BAKIR, A.Y. Screening of fungal strains for polygalacturonase production. *Journal Agricultural Water Resources Research*, v. 6, p. 125-182, 1987.

AKHNAZAROVA, S.; KAFAROV, V. *Experimental optimization in chemistry and chemical engineering*, Moscou: Mir Publishers, 1982.

ALKORTA, I et al. Immobilization of pectin lyase from *Penicillium italicum* by covalent binding to nylon. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 141-146, 1996.

ALKORTA, L. et al. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, v. 33, n.21, 1998.

ALMEIDA, C. et al. Continuous production of Pectinase by immobilized yeast cells on spent grains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 96, n. 6, p. 513-518, 2003.

ASTAPOVICH N.I.; RYABAYA, N.E. Isolation and characterisation of polygalacturonase from *Saccharomyces pastorianus*. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia*, v. 33, p. 287-291, 1997.

BARNBY, F.M.; MORPETH, F.F.; PYLE, D.L. Endopolygalacturonase production from *Kluyveromyces marxianus*. I. Resolution, purification and partial characterization of the enzyme. *Enzyme Microbial Technology*, v. 12, p. 891-897, 1990.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, E. R. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995.

BELL, T.A.; ETCHELLS, J.L. Pectin hydrolysis by certain salt-tolerant yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, v. 4, p. 196-201, 1956.

BETANCOR, L. et al. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.877-882. 2006.

BLANCO, P.; SIEIRO, C.; VILLA, T.G. Production of pectin enzymes in yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, v. 175, p. 1-9, 1999.

BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. *Introdução a química de alimentos*. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela Ltda, 1995.

BOHDZIEWIEZ, J.; BODZEK, M. Ultrafiltration preparation of pectinolytic enzymes from citric acid fermentation broth. *Process Biochemistry*. v. 29, p. 99-107, 1994.

BORIN, M.D.F.; SAID, S.; FONSECA, M.J.V. Purification and biochemical characterization of an extracellular endopolygalacturonase from *Penicillium frequentans*. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 44, p. 1616-1620, 1996.

BRAVO, C.E.C. et al. Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 24, n. 1, p. 137-152, 2000.

BRAWMAN, J.W. *Application of enzymes in fruit juice technology*. In: BIRCH, G.G.;

BLAKCOROUGH, N.; BARKER, J.K. (editores). *Enzymes and food processing*. London: Applied Science, 1981.

CARR, J.G. Tea, coffee and cocoa. In: WOOD, B.J.B. (editor). *Microbiology of fermented foods*, vol. 2. London: Elsevier Science Ltda, 1985.

CHANNE, P.S.; SHEWAL, J.G. Pectinase production by *Sclerotium rolfsii*. Effect of culture conditions. *Folia Microbiologica*, v. 40, p. 111-117, 1995

CHARLEY, V.L.S. Advances in food processing using pectic and other enzymes. *Chemical Industry*, v. 8, p. 30-34, 1969.

CORDEIRO, C.A.M.; MARTINS, M.L.L. Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus* sp. e algumas de suas propriedades. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 1, p. 135-141, jan./mar. 2009.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DE LOURENZO, G.; FERRARI, S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 5, p. 295-299, 2002.

DRAGET, K.I.; SKAK-BRAEK, G. SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 21, p. 47-55, 1997.

DZIEZAK, J.D. Enzymes: catalyst for food processes. *Food Technology*, v. 45, p.78-85, 1991.

ELEGADO, F.B.; FUJIO, Y. Poligalacturonase production by *Rhizopus* spp. *The Journal of General and Applied Microbiology*, v. 39, p. 409-418, 1993.

EGOROV, N.S. et al. Immobilization of polygalacturonase from the yeast *Fabospora macedoniensis* BKM-480. *Biol Nauki*, p. 95-99, 1983.

FAVEY, S. et al. Purification of the acidic pectate lyase of *Erwinia chrysanthemi* 3937 and sequence analysis of the corresponding gene. *Journal General Microbiology*, v. 138, p. 499-508, 1992.

FEDERICI, F. Production purification and partial characterization of na endopolygalacturonase from *Cryptococcus albidus* var. *albidus*. *International Journal General and Molecular Microbiology*, v. 51, p. 139-150, 1985.

FILL, T.P. et al. Co-production of bisphenylpropanoid amides and meroterpenes by an endophytic *Penicillium brasilianum* found in the root bark of *Melia azedarach*. *Z Naturforsch C*, v. 64, p. 355-360, 2009.

FREIRE, D.M.G. Seleção de micro-organismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum*. Rio de Janeiro, 1996. Tese (Doutorado em Bioquímica), Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ.

FUJITA, T.; MAKISHIMA, D.; HAYASHI, H. New convulsive compounds, Brasiliamides A and B from *Penicillium brasilianum* Batista JV-379. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 66, n. 8, p.1697-1705, 2002.

GAVA, A. J. Princípios de tecnologia de alimentos. 1. ed. São Paulo: Nobel, 1998.

GE, H.M. et al. Penicidones A-C, three cytotoxic alkaloidal metabolites of na endophytic *Penicillium* sp. *Phytochemistry*, v. 69, n. 2, p. 571-576, 2008.

GIRARD, C.; JOUANIN, L. Molecular cloning of cDNAs encoding a range of digestive enzymes from aphytophagous beetle, *Phaedon cochleariae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.29, p.1129-1142, 1999.

GODFREY, T.; WEST, S. *Introduction to industrial enzymology*. In: GODFREY, T.; WEST, S. (editores), *Industrial Enzymology*, 2.ed. New York: Stockholm Press, 1996.

GOMES, J. Produção de poligalacturonase por fermentação submersa utilizando *Aspergillus niger* ATCC 9642 em meio sintético. 2010. 53 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus de Erechim, 2010.

GRADE, R.V. et al. Purification, characterization and mode of action of an endo-polygalacturonase from the psychrophilic fungus *Mucor flavus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 321-330, 2003.

GUMMADI, S.N.; PANDA, T. Purification and biochemical properties of microbial pectinases – a review. *Process Biochemistry*, v. 38, n.987, 2003.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. *Amilase Fúngica*. In: *Bioquímica das Fermentações*, 1982.

HART, H.E. et al. Orange finisher pulp as a substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. *Journal of Food Science*, v. 56, p. 480-483, 1991.

HASUNUMA, T.; FUKUSAKI, E.I.; KOBAYASHI, A. Methanol production is enhanced by expression of an *Aspergillus niger* pectin methylesterase in tobacco cells. *Journal of Biotechnology*, v. 106, p.45-52, 2003.

HERTZBERG, P.A.; KVITTINGEN, L.; ANTHOSEN, T. Alginate as immobilization matrix and stabilizing agent in a two-phase liquid system: Application in lipase-catalysed reactions. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 12, p. 42-47, 1992.

HOONDAL, G.S. et al. Microbial alkaline pectinases and their applications:a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p.509-518, 2000.

HOONDAL, G.S. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 59, p. 409-418, 2002.

HORIKOSHI, K. *Enzyme of alkalophiles*. In: FORGARTY, W.M.; KELLY, C.T. (editores). *Microbial Enzymes and Biotechnology*, 2 ed. London/New York: Elsevier Applied Science, 1999.

JACOB, N. et al. Purification and partial characterization of polygalacturonase from *Streptomyces lydicus*. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 6697-6701, 2008.

JAYANI, R.S. et al. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 2931-2944, 2005.

JAUBERT, S. A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *FEBS Letters*, v.14, p. 109-112, 2002.

JORGENSEN, H. Purification and characterization of Five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 851-861, 2003.

KANNOUJIA, D.K.; ALI, S.; NAHAR, P. Pressure-induced covalent immobilization of enzymes onto solid surface. *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, p. 136-140, 2009.

KAPOOR, M. et al. Production and partial purification and characterization of a thermo-alkali stable polygalacturonase from *Bacillus* sp. MG-cp-2. *Process Biochemistry*, v. 36, n. 3, p. 467-473, 2000.

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

KASHYAP, D.R. et al. Production, purification and characterization of pectinase from *Bacillus* sp. DT7. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.16, n. 277-284, 2000.

KOBOYASHI, T. et al. Purification and properties of a low-molecular weight, high-alkaline pectate lyase from an alkaliphilic strain of *Bacillus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 63, p.72-75, 1999.

KONNO, H.; YAMASAKI, Y.; KATOH, K. Exopolygalacturonase from Suspension Cultures of *Marchantia polymorpha*: Its Presence and Involvement in Pectic Polysaccharide Degradation. *Plant Physiology*, v. 73, n. 2, p. 216-222, 1983.

KWON, O.E. et al. Phenylpyropene A and B, new inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium griseofulvum* F1959. *Journal of Antibiotics*, v. 55, n. 11, p. 1004-1008, 2002.

LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, p. 366-375, 2000.

LARSEN, T.O. et al. Solistatinol, a novel phenolic compactin analogue from *Penicillium solitum*. *Tetrahedron Letters*, v. 48, n. 7, p. 1261-1264, 2007.

LEE, J.W. et al. Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 107, n. 1, p. 33-37, 2009.

LEISTNER, L. Mould-fermented foods: recent developments. *Food Biotechnology*, v. 4, p.433-441,1990.

LI, T.P. et al. Optimization of covalent immobilization of pectinase on sodium alginate support. *Biotechnology Letters*, v. 29, n. 9, p. 1413-1416, 2007.

LIANG, L.; LI, Y.; YANG, V. Biomedical application of immobilized enzymes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 89, p. 979-990, 2000.

MACDONALD, H.C.; EVANS, R. Purification and properties of Apple pectinesterase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 70, p. 321-326, 1996.

MARGO, P. et al. Pectinolytic enzymes produced by *Pseudomonas syringae* PV. *Glycinea*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 117, p. 1-6, 1994.

MANACHINI, P.L.; FORTINA, M.G.; PARINI, C. Purification and characterization of pectinesterase and polygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 9, p. 267-271, 1987.

MANACHINI, P.L.; PARINI, C; FORTINA, M.G. Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans*, LV10. *Enzyme Microbiology and Biotechnology*, v. 10, p. 682-685, 1988.

MARCUS, L. et al. Purification and characterization of pectolytic enzymes produced by virulent and hypovirulent isolates of *Rhizoctonia solani* KUHN. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 29, p. 325-336, 1986.

MARTIN, N. et al. Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agro-industrial bioproduct. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 47, n.5, p. 813-819, 2004.

MARTINS, E.S. et al. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 949-954, 2002.

MENONCIN, S. et al. Imobilização de lipases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 2, p. 440-443, 2009.

MINUSSI, R.C. et al. Sugar-cane juice induce pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. *Revista de Microbiologia*, v. 29, n. 4, 1998.

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

MUTLU, M. et al. The use of commercial pectinase in fruit juice industry. Part I: viscosimetric determination of enzyme activity. *Journal of Food Engineering*, v. 41, p. 147-150, 1999.

NAGAI, M. et al. Purification and characterization of an endo-polygalacturonase from *Aspergillus awamori*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 64, p. 1729-1732, 2000.

NIGHOJKAR, S. et al. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as induce. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1136-1140, 2006.

PANAGIOTOU, G.; OLAVARRIA, R.; OLSSON, L. *Penicillium brasilianum* as a enzyme factory; the essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall. *Journal of Biotechnology*, v. 130, p. 219-228, 2007.

PARDO, C.; LAPENÌA, M.A.; GACTO, M. Purification and characterization of an extracellular exopolygalacturonase from *Geotrichum lactis*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 974-977, 1991.

PIETRO, A.D.; RONCERO, M.I.G. Purification and characterization of an exopolygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 145, p. 295-298, 1996.

PITT, J. A laboratory guide to common *Penicillium* species. 3.ed. Austràlia: Food Science Australia Publishers, 2000.

POLIZELI, M.D.L.T.M.; JORGE, J.A.; TEREZI, H.F. Pectinase production by *Neurospora rassa*: Purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. *Journal General Microbiology*, v. 137, p. 1815-1824, 1991.

QUIROGA, E.N. et al. Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Pycnoporus sanguineus*. *Mycological Research*, v. II, n. 3, p. 404-410, 2009.

RESENDE, J. M. et al. Atividade de enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multilocular. *Horticultura Brasileira*, v.22, n.2, p.206-212, 2004.

REVILLA, I.; GANZALEZ SAN-JOSE, M.L. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. *Int. Food Science Technology*, v. 38, p. 29-36, 2003.

RISSO, F.V.A. et al. Study of fructooligosaccharides synthesis from sucrose in aqueous and aqueous-organic systems using immobilized inulinase from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. Aceito para publicação na *International Journal of Food Engineering*, 2010.

RIZZATTO, M.L. Estudo da produção de pectinases por *Penicillium italicum* IZ 1584 e *Aspergillus niger* NRRL 3122 por fermentação semi-sólida em bagaço de laranja industrializado. Campinas, 1999. 89 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos*. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

ROSAS, J. *Curso de Biología Molecular Y Celular*. Enzimas: Aceleradores de las Reacciones Químicas de los Seres Vivos. Disponível em: <<http://interbiologia.virtualave.net/molecula/enzimas.html>>. Acesso em 18 out. 2010.

SAKAI, T.; TAKAOKA, A. Purification crystallization and some properties of endopolygalacturonase from *Aureobasidium pullulans*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 49, p. 449-458, 1984.

SAKAI, T. Degradation of pectins. In: WINKELMANN, G. (editor). *Microbial degradation of natural products*, Weinheim: VCH, 1992.

SAKAI, T. et al. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties and applications. *Advances in Applied Microbiology*, v.39, p. 231-294, 1993.

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

SCHÜRMAN, B.T.M.; SALLUM, W.S.T.; TAKAHASHI, J.A. Austin, dehydroaustin and other metabolites from *Penicillium brasilianum*. *Química Nova*, v. 33, n. 5, p. 1044-1046, 2010.

SINGH, S.A. RAMAKRISHNA, M.; RAO, A.G.A. Optimization of down-stream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented broth of *Aspergillus carbonarius*. *Process Biochemistry*, v. 35, p.411-417, 1999.

SINGH, S.A.; PLATTNER, H.; DIEKMANN, H. Exo polygalacturonate lyase from thermophilic *Bacillus* sp. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, p. 420-425, 1999.

SCOTT, D. Enzymes, industrial. In: GRAYSON, M.; EKARTH, D.; OTHMER, K. (editor). *Encyclopedia of chemical technology*. New York: Wiley, 1978.

SCHWAN, R.F.; ROSE, A.H. Polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 76, p. 62-67. 1994.

SMIDSRØD, O.; SKAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, v. 8, p. 71-78, 1990.

SMITH, J.J.; LILLY, M.D.; FOX, R.I. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology Bioeng*, v. 35, p. 1011-1023, 1990.

SONG, Y.S. et al. Performance of  $\beta$ -galactosidase pretreated with lactose to prevent activity loss during the enzyme immobilisation process. *Food Chemistry*, v. 123, p.1-5, 2010.

SOUZA, R.L.A. et al. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 14, n. 9, p. 987-992, 2010.

SPAGNA, G.; PIFFERI, P.G.; GILIOLI, E. Immobilization of a pectinlyase from *Aspergillus niger* for application in food technology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, p. 729-738, 1995.

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Occurrence and structural diversity of fungal metabolites with antibiotic activity. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TAKAO, M. et al. Purification and characterization of thermostable pectate lyase with protopectinase activity from thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.64, p. 2360-2367, 2000.

TAKAO, M. et al. Molecular cloning, DNA sequence, and expression of the gene encoding for thermostable pectate lyase of thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 65, p. 322-329, 2001.

TAQIEDDIN, E.; AMIJI, M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosa core-shell microcapsules. *Biomaterials*, v. 25, p. 1937-1945, 2004.

TARI, C. et al. Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produce by *Aspergillus sojae*. *Food Chemistry*, v. 111, p. 824-829, 2008.

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

UHLIG, H. *Industrial enzymes and their applications*, New York: A Wiley Interscience Publication, 1998.

VAUGHN, I.L.H. et al. Some pink yeasts associated with softening of olives. *Applied in Microbiology*, v. 18, p. 771-775, 1969.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lípases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, n. 4-6, p.113-148, 2000.

WHITAKER, J.R. *Microbial pectinolytic enzymes*. In: FOGARTY, W.M.; KELLY, C.T. (editores). *Microbial enzymes and biotechnology*. 2.ed. London: Elsevier Science Ltda, 1990.

WHITAKER, J.R. *Principles of enzymology for the food science*. 2. ed. New York: Marcel Dekker- Inc. 1994.

WISEMAN, A. Manual de biotecnologia de los enzimas, Zaragoza: Acribia, 1991.

ZENI, J. Screening de microrganismos produtores de carotenóides e poligalacturonases. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - Campus de Erechim, 2009.

ZHENG, Z.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 825-830, 2000.