



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
ENGENHARIA DE ALIMENTOS



PEDRO RENANN LOPES DE FRANÇA

**DEGRADAÇÃO DE PECTINA EM SUCO DE CAJU POR
POLIGALACTURONASE DE *Aspergillus aculeatus* URM4953
IMOBILIZADA COVALENTEMENTE EM PÉROLAS DE
ALGINATO**

Garanhuns

2018

PEDRO RENANN LOPES DE FRANÇA

**DEGRADAÇÃO DE PECTINA EM SUCO DE CAJU POR
POLIGALACTURONASE DE *Aspergillus aculeatus* URM4953
IMOBILIZADA COVALENTEMENTE EM PÉROLAS DE
ALGINATO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a
Universidade Federal Rural de
Pernambuco/Unidade Acadêmica de
Garanhuns como exigência para obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador (a): Prof. Dra. Tatiana Souza Porto

Coorientador (a): Jônatas de Carvalho Silva

Garanhuns

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns-PE, Brasil

F814s França, Pedro Renann Lopes de
Degradação de pectina em suco de caju por
poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953
imobilizada covalentemente em pérolas de alginato
/ Pedro Renann Lopes de França. – 2018.
100 f. : il.

Orientadora: Tatiana Souza Porto.
Coorientador: Jônatas de Carvalho Silva.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação de
Engenharia de Alimentos)–Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Departamento de Engenharia de Alimentos,
Garanhuns, BR - PE, 2018.
Inclui referências e apêndices

1. Tecnologia de alimentos 2. Caju – controle de qualidade
3. Enzimas - aplicações Industriais. 4. Pectinase I. Porto,
Tatiana Souza, orient. II. Silva, Jônatas de Carvalho, coorient.
III. Título

CDD 664

Pedro Renann Lopes de França

**DEGRADAÇÃO DE PECTINA EM SUCO DE CAJU POR
POLIGALACTURONASE DE *Aspergillus aculeatus* URM4953
IMOBILIZADA COVALENTEMENTE EM PÉROLAS DE
ALGINATO**

APROVADO: 20 de agosto de 2018

Dra. Tatiana Souza Porto (Presidente)
Unidade Acadêmica de Garanhuns, UFRPE

Dra. Andréa Galindo Carneiro Rosal (Membro Titular Interno)
Unidade Acadêmica de Garanhuns, UFRPE

Dra. Camila Souza Porto (Membro Externo)
Campus Arapiraca, UFAL

AGRADECIMENTOS

Essa com certeza foi a parte mais difícil de escrever de todo este trabalho, pois, a vida não está sujeita a uma análise estatística, que permita determinar quais pessoas foram significantes ao longo de minha trajetória até aqui. E não será por esse simples texto, que poderei expressar toda minha gratidão e amor por cada um aqui citado.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. E por estar ao meu lado ao longo de todo o percurso que fiz até aqui.

Agradeço a minha mãe (Creuza), a meu pai (Pedro) e as minhas irmãs Patrícia, Michelle, Julia e Fernanda, por serem minha base, por todo apoio e paciência que tiveram comigo, principalmente quando prestavam atenção, forçadamente, aos meus treinamentos para apresentar o PIBIC. Especialmente a minha mãe, que foi a pessoa que me deu maior apoio ao longo desses quase 5 anos de curso, seja sentimental ou financeiro.

Agradeço a professora Tatiana Souza Porto, que foi mais que uma simples orientadora, foi a minha mãe científica, me auxiliando nos meus primeiros passos nessa vida de pesquisa. Que Deus lhe ilumine sempre e permita, que assim como foi comigo, você inspire muitas outras pessoas a serem pessoas e profissionais melhores. Obrigado por ser a melhor orientadora que eu poderia ter.

Agradeço a todos os professores do curso da Engenharia de Alimentos – UFRPE/UAG, por toda a contribuição para minha formação e para minha futura vida profissional.

Agradeço a todo o grupo de pesquisa do CENLAG por me auxiliar em muitos dos experimentos que compuseram meus resultados. Obrigado Elizane, por ser uma ótima companhia de laboratório, tão boa quanto é para escutar minhas lamentações e os babados dos famosos no meio da madrugada. A Allan, agradeço por ter me acompanhado ao longo de muitos dias, e algumas vezes a noite, você foi uma das pessoas mais icônicas que passou pelo CENLAG, a suas mentiras e péssimas interpretações alegraram a todos.

Não poderia deixar de fora meu coorientador, Jônatas, que foi não só meu braço direito, mas também, o esquerdo e as minhas pernas, o maior fruto de nossa parceria não foi esse trabalho, nem as publicações, mas sim, a amizade que construímos, tão grande quanto a sua testa de marquise. Que essa amizade se perpetue por muitos anos, pois ela é

muito valiosa para mim. Não existe melhor frase que nos defina, que este meme: *somos mais que amigos, somos friends*.

Agradeço ao meu *cluster* por todos os trabalhos que fizemos juntos. Avla, seu estresse sempre foi a melhor descontração que poderíamos ter nas madrugadas que passamos fazendo trabalho. Giovanna, a nossa fiel ditadora e organizadora, obrigado por tudo, principalmente pelos memes idiotas que a gente vive trocando. Marcos, agradeço por todos os trabalhos que fizemos juntos e até pelos seus julgamentos péssimos que você inevitavelmente faz. Que esse *cluster* seja muito duradouro e sobreviva a todos os *sussurros* que possamos enfrentar juntos.

Ao restante da sala meus sinceros agradecimentos pela companhia de vocês ao longo desses anos. A minha POC (Carol), pelas conversas nem um pouco produtivas que temos e vídeos sem noção que a gente sempre troca. A Pedro, por ser sempre gótico e trevoso, mas também um amorzinho, você é meu espírito animal, muito obrigado por todos os memes que trocamos por todos esses anos. A Junin @, que mesmo só me batendo o tempo todo, você sempre foi uma boa companhia, principalmente pela sua pele uniforme e seu cabelo sedoso, espero que em um futuro próximo você seja menos violento. A Marcelo, pela pessoa maravilhosa que você sempre foi, tirando a parte do deboche, muito obrigado por as inúmeras vezes que me deixou dormir na sua casa. A Angel, pela sua estranheza que sempre me cativou. A Priscilão, por ser uma pessoa tão solícita. A Aline, por todas as fofocas que fizemos. A dupla paredão (Érica e Monnykhe) por todos os besteiróis que conversamos juntos. Aos meninos, Elyson, Emerson e Xan, por serem ótimos nos *rolê*. Como já disse algumas vezes, mas não sóbrio, eu amo vocês demais.

Agadeço a FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

RESUMO

A poligalacturonase (PG) é a principal enzima pectinolítica que catalisa a reação de degradação da pectina. Sua forma imobilizada é geralmente preferida, devido a possibilidade de inúmeros reusos. Baseado nisto, o presente trabalho objetivou imobilizar e realizar caracterização bioquímica cinética e termodinâmica da poligalacturonase (PG) de *Aspergillus aculeatus* URM4953 para processamento do suco de cajú. O processo de otimização de imobilização teve um rendimento máximo de 95%. O pH ótimo ambas as formas da PG (livre e imobilizada) apresentou dois picos evidentes a pH 4,0 (ácido) e pH 7,0 (neutro). Apesar da temperatura ótima da PG, ter diferido em ambas as formas, livre (50°C) e imobilizada (40°C), as PG's exibiram uma atividade residual semelhante ao longo das diferentes temperaturas. A afinidade das diferentes formas da PG decaiu com o aumento da temperatura, sendo maior para a enzima imobilizada. Contudo, do ponto de vista cinético a PG livre apresentou melhor comportamento geral (maiores V_{max} e K_{cat}). Os parâmetros termodinâmicos de termoinativação da PG imobilizada tais como, entalpia ($86,5 \leq \Delta H^*_d \leq 86,26$ kJ/mol), entropia ($-39,7 \leq \Delta S^*_d \leq -41,9$ J/K.mol) e energia livre de gibbs ($98,6 \leq \Delta G^*_d \leq 100,1$ kJ/mol), sugeriram um predominante mecanismo de desnaturação reversível, o que permitiu 4 sucessivos reusos da PG imobilizada com apenas 34% de perda da atividade. Para o processamento do suco de caju utilizando apenas a PG imobilizada, a temperatura de maior degradação do conteúdo pectico foi a 20°C e sua cinética foi modelada pela equação de Hill (devido ao comportamento alostérico apresentado). O número de Hill aumentou de 3 (20°C) para 5 (50°C) evidenciando um mecanismo de cooperação positiva. A energia de ativação (E^*) e a entalpia padrão de equilíbrio de desdobramento (ΔH^*_u) da reação foram de 80,31 e 16,57 kJ/mol, respectivamente. Ambos os parâmetros cinéticos e termodinâmicos de hidrólise corroboraram e demonstraram a maior espontaneidade de hidrólise da pectina do suco de caju a 20°C, exibindo valores de ΔG^* , ΔH^* e ΔS^* de 59,3 kJ/mol, 77,9 kJ/mol e 63,4 J/K.mol, respectivamente. Esses resultados mostraram um satisfatório desempenho da PG, principalmente em sua forma imobilizada, podendo ser posteriormente utilizada para a fundamentação teórica de aplicações desta enzima em diferentes processos industriais.

Palavras-chaves: Poligalacturonase, *Aspergillus aculeatus*, imobilização, parâmetros cinéticos, parâmetros termodinâmicos, caju, degradação da pectina

ABSTRACT

Polygalacturonase (PG) is the main pectinolytic enzyme that catalyzes the degradation reaction of pectin. Its immobilized form is generally preferred because of the possibility of numerous reuses. Based on this, the present work aimed to immobilize and perform kinetic and thermodynamic biochemical characterization of polygalacturonase (PG) from *Aspergillus aculeatus* URM4953 to process cashew juice. The immobilization optimization process had a maximum redemption of 95%. The optimum pH of both forms of PG (free and immobilized) presented two evident peaks at pH 4.0 (acid) and pH 7.0 (neutral). Although the PG optimum temperature differed in both forms, free (50 ° C) and immobilized (40 ° C), PGs exhibited similar residual activity over different temperatures. The affinity of the different forms of PG decreased with increasing temperature, being higher for the enzyme immobilized. However, from the kinetic point of view the free PG presented better general behavior (higher V_{max} and K_{cat}). The thermodynamic parameters of thermoinactivation of immobilized PG such as enthalpy ($86.5 \leq \Delta H^*_d \leq 86.26$ kJ / mol), entropy ($-39.7 \leq \Delta S^*_d \leq -41.9$ J / K.mol) and free energy of gibbs ($98.6 \leq \Delta G^*_d \leq 100.1$ kJ/mol), suggested a predominant mechanism of reversible denaturation, which allowed 4 successive reuses of PG immobilized with only 34% loss of activity. For the processing of cashew juice using only immobilized PG, the temperature of the highest degradation of the pectic content was at 20 ° C and its kinetics was modeled by the Hill equation (due to the presented allosteric behavior). Hill's number increased from 3 (20 °C) to 5 (50 °C), indicating a positive cooperation mechanism. The activation energy (E^*) and the standard entropy of equilibrium unfolding (ΔH^*_u) of the reaction were 80.31 and 16.57 kJ / mol, respectively. Both kinetic and thermodynamic parameters of hydrolysis corroborated and demonstrated the higher hydrolysis expontance of pectin of cashew juice at 20 ° C, exhibiting values of ΔG^* , ΔH^* and ΔS^* of 59.3 kJ/mol, 77.9 kJ/mol and 63.4 J/K.mol, respectively. These results showed a satisfactory performance of PG, mainly in its immobilized form, and it can be laterally used for the theoretical basis of applications of this enzyme in different industrial processes.

Keywords: Polygalacturonase, *Aspergillus aculeatus*, immobilization, kinetic parameters, temodynamic parameters, cashew apple, pectin degreadation

LISTA DE ABREVIATURAS

HG – Homogalacturonan
RG-I – Rhamnogalacturonan I
RG-II – Rhamnogalacturonan II
PPases – Protopectinases
PE – Pectina esterase
PME – Pectina metil esterase
PGL – Pectato liase
PL – Pectina liase
PG – Poligalacturonase
exoPG – exoPoligalacturonases
EndoPG – endoPoligalacturonases
FS – Fermentação submersa
FES – Fermentação em estrado sólido
PCC – Planejamento Composto Central
Y – Rendimento de imobilização
 k_m – Constante de Michaelis-menten
 V_{max} – Velocidade máxima da reação
 k_{cat} – Constante catalítica
 E_0 – Concentração proteica
 E^* – Energia de ativação
 K_{eq} – Constante de equilíbrio
 k_0 – Taxa específica inicial de hidrolise
 A_0 – Frequência de colisão
R – Constante dos gases ideias
T – Temperatura
 ΔG^* – Energia livre de gibbs de ativação
 ΔH^* – Entalpia de ativação
 ΔS^* – Entropia de ativação
h – Constante de Planck
 k_b - Constante de Boltzmann
 ΔH_u° – Entalpia padrão de equilíbrio do desdobramento proteico
A – Atividade enzimática
t – Tempo
 k_d – Constante de desnaturação de primeira ordem
 E_d^* – Energia de ativação da termoinativação
 $t_{1/2}$ – Tempo de meia vida
D – Tempo de redução decimal
Z – Fator de sensibilidade
 ΔG_d^* – Energia livre de gibbs de ativação
 ΔH_d^* – Entalpia de termoinativação
 ΔS_d^* – Entropia de termoinativação
V – velocidade de reação
[S] – Concentração de substrato
P – Concentração de açúcar redutor
k – Constante cinética
m – Parâmetro característico do complexo enzima-substrato
SST – Sólidos solúveis totais

E – Enzima

S – Substrato

P_d – Produto da reação enzimática

ES – Complexo Enzima-Substrato

k_a – Constante de associação do complexo Enzima-Substrato

k_d – Constante de dissociação do complexo Enzima-Substrato

Θ – Fração de sítios ativos ocupados

K_{0,5} – Constante de afinidade para substratos complexos

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Fig 1.1. Ação das diferentes enzimas pectinolíticas. (A) ação da pectina esterase; (B) ação da pectato liase; (C) ação da pectina liase; (D) ação da endopoligalacturonase; (E) ação da exopoligalacturonase. Fonte: o autor18

Fig. 1.2. Diferentes técnicas de imobilização enzimática. (A) imobilização por adsorção; (B) imobilização por ligação covalente; (C) imobilização por encapsulação. Adaptado de (SOUZA et al., 2017).22

Fig. 1.3. Mecanismo reacional apresentado por enzimas que exibem cooperatividade positiva. E, enzima; S₁ e S₂, substratos; P, Produto. Fonte: o autor.24

CAPÍTULO I

Fig. 2.1. Imobilização por ligação covalente de poligalacturonase do *Aspergillus aculeatus* URM4953 em pérolas de alginato de cálcio. (A) Superfície de resposta do rendimento de imobilização versus concentração de glutaraldeído e tempo. (B) Gráfico de Pareto mostrando os efeitos lineares e quadráticos no rendimento.47

Fig. 2.2. Caracterização bioquímica da poligalacturonase do *Aspergillus aculeatus* URM4953 livre e imobilizada por ligação covalente em alginato de cálcio. (A) perfil da atividade enzimática em diferentes pH's, (B) perfil da atividade enzimática em diferentes temperaturas, (C) perfil estabilidade enzimática em diferentes temperaturas.48

Fig. 2.3. Reutilização da poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio.....50

CAPÍTULO II

Fig. 3.1. Temperatura ótima de hidrólise da pectina de suco de caju pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio.78

Fig. 3.2. Influência da concentração de pectina na taxa de hidrólise da pectina de suco de caju pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalente em pérolas de alginato de cálcio.79

Fig. 3.3. Cinética de biodegradação da pectina de suco de caju (pela PG de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio) adaptada aos modelos de Ghose-Walseth, em diferentes temperaturas.82

Fig. 3.4. Evolução ao longo do tempo do (A) pH, (B) cor e (C) sólidos solúveis totais (SST), durante o tratamento enzimático do suco de caju pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio.....84

Fig. 3.5. Gráfico semi-log de Arrhenius da atividade inicial da poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em alginato de cálcio, em suco de caju versus o inverso da temperatura.**85**

LISTAS DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 2.1. Planejamento composto central (PCC) utilizado para a otimização da imobilização por ligação covalente da poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 em pérolas de alginato de cálcio.....**46**

Tabela 2.2. Parâmetros cinéticos em diferentes temperaturas da poligalacturonase do *Aspergillus aculeatus* URM4953 livre e imobilizada por ligação covalente em alginato de cálcio.....**50**

Tabela 2.3. Energia de ativação (E^*) da degradação de pectina pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 e variação de entalpia padrão (ΔH_u°) de equilíbrio do desdobramento da enzima estimado em diferentes concentrações de pectina, usando a enzima livre e a enzima imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio.**51**

Tabela 2.4. Energia livre de Gibbs de ativação (kJ/mol) da degradação da pectina pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953, na forma livre e imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio, em diferentes temperaturas.**53**

Tabela 2.5. Entalpia (ΔH^*) e entropia (ΔS^*) de ativação da degradação da pectina pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953, na forma livre imobilizada e covalentemente em pérolas de alginato de cálcio, a diferentes temperaturas e concentrações de pectina.**54**

Tabela 2.6. Parâmetros cinéticos da inativação térmica da poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953, na forma livre e imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio, a diferentes temperaturas.**55**

Tabela 2.7. Energia livre de Gibbs de ativação (ΔG_d^* , kJ/mol), entalpia de ativação (ΔH_d^* , kJ/mol) e entropia de ativação (ΔS_d^* , J/mol.K) da termoinativação da poligalacturonase do *Aspergillus aculeatus* URM4953, na forma livre e imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio, a diferentes temperaturas.**56**

CAPÍTULO II

Tabela 3.1. Parâmetros cinéticos da hidrólise da pectina de suco de caju pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio.....**79**

Tabela 3.2. Parâmetros termodinâmicos da hidrólise da pectina de suco de caju pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato.**86**

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
OBJETIVOS	14
Objetivo geral	14
Objetivos específicos	14
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1. Pectinases e as substâncias pécicas	15
1.1.1. <i>Protopectinases</i>	16
1.1.2. <i>Enzima desmetoxilante ou desesterificante</i>	16
1.1.3. <i>Enzimas despolimerizantes</i>	16
1.1.3.1. <i>Liases</i>	17
1.1.3.2. <i>Hidrolases</i>	17
1.2. Produção de pectinases	19
1.3. Imobilização	21
1.4. Cinética enzimática	23
1.4. Termodinâmica enzimática	24
1.6. Processamento de sucos de frutas	25
1.7. Caju (<i>Anacardium occidentale L.</i>)	26
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E TERMODINÂMICA DE UMA NOVA POLIGALACTURONASE DE <i>Aspergillus aculeatus</i> URM4953: COMPARAÇÃO DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA EM ALGINATO DE CÁLCIO	36
RESUMO	37
ABSTRACT	38
2.1. Introdução	32
2.2. Materiais e métodos	40
2.2.1 <i>Micro-organismo</i>	40
2.2.2 <i>Produção de poligalacturonase por fermentação submersa (FS)</i>	40
2.2.3 <i>Atividade enzimática</i>	40
2.2.4 <i>Otimização da imobilização da poligalacturonase por ligação covalente em pérolas de alginato de cálcio</i>	41
2.2.5 <i>Efeito do pH na atividade enzimática</i>	42
2.2.6 <i>Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática</i>	42
2.2.7 <i>Múltiplos reusos da poligalacturonase imobilizada</i>	42
2.3. Teoria	44
2.3.1. <i>Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da reação enzimática</i>	43
2.3.2. <i>Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da termoinativação</i>	38
2.4. Resultados e discussão	46
2.4.1 <i>Otimização da imobilização da poligalacturonase</i>	46
2.4.2 <i>Efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade da poligalacturonase</i>	48

2.4.3 Cinética da degradação da pectina pela poligalacturonase	50
2.4.4 Termodinâmica de degradação da pectina pela poligalacturonase	51
2.4.5 Cinética da inativação térmica da poligalacturonase.....	55
2.4.7 Termodinâmica de inativação térmica da poligalacturonase	56
2.5. Conclusão	59
2.6. Agradecimentos	59
REFERÊNCIAS	59

CAPÍTULO II: HIDRÓLISE DE PECTINA DE SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale*) PELA POLIGALACTURONASE DE *Aspergillus aculeatus* URM4953 IMOBILIZADA COVALENTEMENTE EM PÉROLAS DE ALGINATO DE CÁLCIO: ESTUDO CINÉTICO E TERMODINÂMICO.....

RESUMO	68
ABSTRACT	69
3.1. Introdução	70
3.2. Materiais e métodos	72
3.2.1 Micro-organismo	72
3.2.2 Produção de poligalacturonase por fermentação submersa (FS).....	72
3.2.3 Atividade enzimática	73
3.2.4 Imobilização covalente da poligalacturonase em pérolas de alginato de cálcio.....	73
3.2.5 Determinação da concentração de pectina	74
3.2.6 Cinética de degradação da pectina de suco de suco de caju	74
3.2.7 Caracterização Físico-Química do suco	75
3.3. Teoria	75
3.3.1. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da da ação da PG sobre a pectina do suco de caju	75
3.4. Resultados e discussão	71
3.4.1 Temperatura ótima e parâmetros cinéticos da hidrólise da pectina.....	77
3.4.2 Caracterização físico-química do suco	83
3.4.3 Termodinâmica da hidrólise de pectina em suco de caju.....	84
3.5. Conclusão	86
3.6. Agradecimentos	87
REFERÊNCIAS	87

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....

APÊNDICE I: OPTIMIZED EXTRACTION OF POLYGALACTURONASE FROM *Aspergillus aculeatus* URM4953 BY AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS PEG/CITRATE.....

APÊNDICE II: CLARIFICAÇÃO DO SUCO DE CAJÁ (*Spondias mombin* L.) UTILIZANDO PECTINASES DE *Aspergillus aculeatus* URM4953

INTRODUÇÃO

As pectinases são enzimas que possuem o potencial de degradação das substâncias pectínicas, carboidratos presentes na lamela média das paredes celulares primárias dos tecidos vegetais que conferem a estrutura rígida dos vegetais (MARTOS et al., 2014). Estas enzimas podem ser divididas em 3 grupos conforme seu mecanismo de atuação na molécula de pectina. As desesterificantes ou desmetoxilantes catalisam a hidrólise dos grupos metil da pectina (HABRYLO et al., 2018). As protopectinases são enzimas que atuam na protopectina, sendo responsáveis por transformar a protopectina insolúvel em pectina polimerizada solúvel (UENOJO; PASTORE, 2007). As despolimerases são enzimas que atuam na principal cadeia, a cadeia polimérica, clivando as ligações glicosídicas α -1,4 (hidrolases) ou catalisam a β -eliminação (liases ou transeliminases) (KASHYAP et al., 2001). Dentre as despolimerases, as poligalacturonases são as enzimas de maior interesse comercial (OZUNA; BARRO, 2017).

As enzimas pectinolíticas podem ser oriundas de vegetais ou micro-organismos (POONDLA et al., 2016). Dependendo de alguns fatores, como, linhagem do fungo, da natureza e concentração da fonte de carbono do meio de cultura as pectinases podem apresentar características diferenciadas (HOONDAL et al., 2002). Sendo os fungos são os mais utilizados em escala industrial (PEREIRA et al., 2017).

No mercado industrial, a pectinase representa quase 25% das vendas globais de enzimas (YUAN et al., 2011) e especificamente, equivalem a aproximadamente 10% da produção total de enzimas (KOHLI; GUPTA, 2015). A indústria de alimentos tem sido a principal consumidora de enzimas pectinolíticas, dando-se destaque a indústria de processamento de sucos, proporcionando redução do tempo de filtração e aumento de volume de clarificação de sucos, além de conferir maior estabilidade ao produto concentrado (UENOJO; PASTORE, 2007).

A turbidez dos sucos de fruta surge imediatamente após o seu processamento, e geralmente é considerada o produto de partículas suspensas de pectina provenientes da parede celular das plantas. Assim, a maioria das bebidas de frutas processadas industrialmente são clarificadas durante a produção a fim de evitar a turbidez indesejável e sedimentos no produto final, podendo ser realizada através da adição de enzimas pectinolíticas e agentes clarificantes. Além da redução da turbidez, as enzimas

pectinolíticas acarretam o aumento da produtividade por uma maior extração da polpa e a melhor filtrabilidade dos sucos (KEMPKA; PRESTES; ALVIERO, 2013).

Apesar da grande importância e necessidade, o uso de enzimas na indústria geralmente é de alto custo, principalmente em sua forma solúvel, pois não permite o reuso destes biocatalizadores. Porém, o processo de imobilização da enzima em um suporte sólido apresentando-se como uma solução (MENDES et al., 2011). Essa técnica proporciona heterogeneidade dos sistemas, fácil recuperação das enzimas e dos produtos, rápida interrupção das reações, maior estabilidade ao pH e à temperatura, além de permitir a operação contínua com uma variedade de diferentes biorreatores (KRAJEWSKA, 2004).

A imobilização enzimática pode ser conseguida essencialmente por três métodos distintos: por meio da adsorção, encapsulação da enzima ou ligação covalente (PETKOVA; ZÁRUBA; KRÁL, 2012). Este último, destaca-se pela sua elevada eficiência, o que permite altos rendimentos do processo, sendo realizada pela ativação dos suportes com inserção de grupos reativos que reagem com resíduos de aminoácidos da enzima (MENDES et al., 2011). O suporte a ser utilizado na imobilização é de grande importância, por promover uma maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada (MENDES et al., 2011). Um determinado material que deve ser utilizado como suporte de imobilização necessita apresentar algumas características como alta afinidade por proteínas, grande disponibilidade de grupos reativos, alta capacidade de carregamento, estabilidade mecânica e rigidez. Assim, o alginato tem se destacado como suporte de imobilização de biomoléculas, devido a suas características positivas que contribuem para o processo, aliadas ao seu baixo custo (PALLA; PACHECO; CARRÍN, 2011).

Contudo, para garantir uma aplicação eficiente, a nível industrial, da enzima o conhecimento de parâmetros bioquímicos, cinéticos e termodinâmicos da enzima é fundamental, pois permite manter um nível desejado de atividade enzimática por um longo período de tempo, deste modo a correta compreensão destes parâmetros, juntamente à modelagem matemática, torna-se possível estimar resultados em sistemas reais não estudados (EL-LOLY; AWAD; MANSOUR, 2007; SOUZA et al., 2010).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Imobilizar e realizar caracterização bioquímica cinética e termodinâmica da poligalacturonase (PG) de *Aspergillus aculeatus* URM4953 para processamento do suco de cajú.

Objetivos específicos

- Otimizar a imobilização da PG de *A. aculeatus* URM4953 em alginato de cálcio por ligação covalente utilizando o planejamento central composto;
- Determinar a quantidade de ciclos de reuso da PG imobilizada;
- Caracterizar bioquimicamente a PG (livre e imobilizada) em relação ao pH e temperatura ótimos, estabilidade a temperatura, parâmetros cinéticos;
- Estimar parâmetros termodinâmicos da PG (livre e imobilizada) por meio de equações empíricas e valores experimentais;
- Determinar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos de degradação da pectina em suco de caju pela PG imobilizada;
- Analisar o modelo cinético de hidrólise da pectina em suco de caju.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Pectinases e as substâncias pécticas

As enzimas pécticas, pectinolíticas ou pectinases, compreendem um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam as substâncias pécticas, presentes principalmente nas plantas (XIA; LI, 2018).

As substâncias pécticas são polissacarídeos encontrados principalmente na lamela média de plantas superiores, sendo de longe, o carboidrato mais complexo e interessante, em relação a organização estrutural e funcionalidade, formador de paredes celulares vegetais (YAPO, 2011). São constituídas majoritariamente por unidades de ácido galacturônico unidas covalentemente por ligações glicosídicas α -1,4, estando parcialmente esterificados (COBS-ROSAS et al., 2015).

A molécula da pectina possui duas regiões distintas conhecidas como “regiões lisas”, que possuem uma estrutura linear sem apresentar cadeias laterais, e as “regiões capilares”, que apresentam ramificações geradas pela presença de cadeias laterais (ANURADHA et al., 2010).

As regiões lisas são compostas pelo homogalacturonan (HG), que possui 65% da pectina e é o principal tipo de pectina presente nas paredes celulares vegetais. As regiões capilares são constituídas pelos rhamnogalacturonan I (RG-I) e o rhamnogalacturonan II (RG-II). O RG-I apresenta cerca de 20 a 35% de pectina e o restante corresponde a dissacarídeos ramnose-ácido galacturônico. Os resíduos de ácido galacturônico podem ser cetilados, podendo conter também cadeias laterais de açúcares neutros, tais como, galactose, arabinose e xilose. O RG-II contém cerca de 10% de pectina, sendo uma região de HG, mas com cadeias laterais complexas ligadas aos resíduos galacturônicos. O RG-I e o RG-II, são componentes estruturalmente mais complexos que o HG (KOHLI; GUPTA, 2015; NOREEN et al., 2017).

Baseado em sua composição a American Chemical Society classifica as substâncias pécticas em quatro principais grupos: a protopectina (insolúvel em água e unida com outros constituintes das células vegetais); ácido péctico (é essencialmente não esterificado), ácido pectínico (apresenta um grau de esterificação menor que 75%) e pectina (possui um grau de esterificação igual ou superior a 75% , sendo solúvel em água

e capaz de formar géis) (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; FARAVASH; ASHTIANI, 2008).

De acordo com o mecanismo de ação sobre a molécula de pectina estas enzimas podem ser divididas em 3 grupos distintos que são classificadas e nomeadas de acordo com a “Enzyme Commission” (EC), segundo as recomendações da International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUPAC-IUB3:

1.1.1. Protopectinases

As protopectinases (PPases) atuam sobre a protopectina liberando pectina solúvel (LIU et al., 2006). Elas são classificadas em dois tipos, baseado no seu mecanismo de ação: as PPases do tipo A, que reagem com o sítio interno, isto é, a região do ácido poligalacturônico da protopectina, enquanto as PPases do tipo B reagem no sítio externo, que compreende cadeias polissacarídicas que podem ligar a cadeia do ácido poligalacturônico e os constituintes da parede celular (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). Estas enzimas não são abundantes e possuem pouco interesse industrial na degradação da pectina (UENOJO; PASTORE, 2007).

1.1.2. Enzima desmetoxilante ou desesterificante

Os resíduos de ácido α -D-galacturônico formadores da molécula de pectina, podem ser metil esterificado, cujo o grau de metoxilação varia com base na fonte (RAJULAPATI et al., 2018). A mais conhecida a EC 3.1.1.11 pectina esterase (PE) ou pectina metil esterase (PME) (Fig. 1.1A), catalisam a desesterificação da pectina com liberação de metanol e ácidos mono e poligalacturônicos (SPAGNA; BARBAGALLO; INGALLINERA, 2003), o que facilita a atuação das enzimas despolimerases (HABRYLO et al., 2018).

1.1.3. Enzimas despolimerizantes

A depender do mecanismo de clivagem das ligações glicosídicas as pectinases despolimerizantes podem ser classificadas em: hidrolases (clivagem hidrolítica) e liases (clivagem transeliminativa) (UENOJO; PASTORE, 2007):

1.1.3.1. Liases

Estas realizam a quebra de substâncias pécnicas por meio de reações não hidrolíticas, que se caracteriza pela divisão transeliminativa do polímero pécnico, resultando em produtos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). A literatura descreve duas enzimas que compõem este grupo, a EC 4.2.2.2 pectato liase – PGL (que atua sobre o ácido pécnico) (Fig. 1.1B) e a EC 4.2.2.10 pectina liase - PL (que atua sobre a pectina) (Fig. 1.1C)(KASHYAP et al., 2001).

1.1.3.2. Hidrolases

Compreendem as poligalacturonases (PG's), as quais catalisam a clivagem hidrolítica das substâncias pécnicas com a introdução de água (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005). E de acordo com a sua atuação elas são divididas nas E.C. 3.2.1.67 exoPG (que atuam a partir do final da molécula, tendo como produto monômeros de ácidos galacturônicos) (Fig. 1.1E) e nas EC 3.2.1.67 endoPG (que apresenta ação randômica liberando poli e oligossacarídeos) (Fig. 1.1D) (KASHYAP et al., 2001; HABRYLO et al., 2018). Dentre todas as enzimas pectinolíticas a PG é a mais amplamente estudada e utilizada comercialmente por ter a principal e maior função hidrolítica na cadeia polimérica (LI et al., 2017).

O pH e a temperatura são parâmetros de grande influência na atividade enzimática. Contudo, a PG pode apresentar atividade ótima em uma ampla faixa de pH, em geral, as pectinases fúngicas são enzimas ácidas enquanto que as bacterianas são alcalinas, o que influencia diretamente sua aplicação na indústria (ANAND; YADAV; YADAV, 2017; EVANGELISTA et al., 2018). Enquanto, que temperatura ótima de PG's de origem microbiana pode variar de 35 a 60°C (DEY et al., 2014).

Em relação a seu peso molecular as PG's são enzimas monoméricas com um peso molecular varia em uma faixa de 35 a 79 kDa (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005), como mostrado nos estudo de Nakkeeran, Subramanian e Umesh-Kumar (2010) que purificaram uma PG proveniente do *Aspergillus carbonarius* com 42 kDa e com Martos et al. (2014) que purificaram uma poligalacturonase de 43 kDa do *Wickerhamomyces anomalus*.

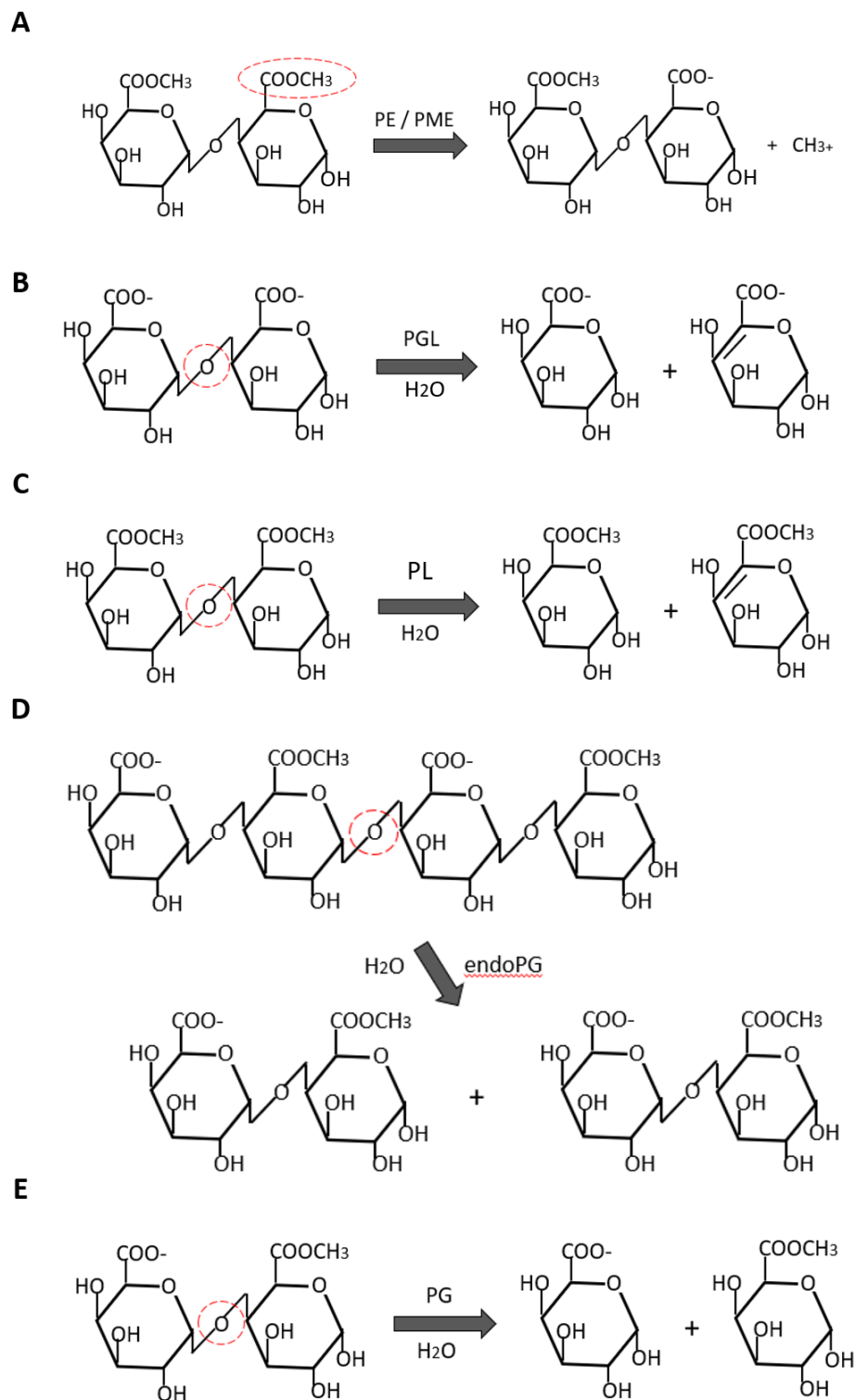


Fig 1.1. Ação das diferentes enzimas pectinolíticas. (A) ação da pectina esterase; (B) ação da pectato liase; (C) ação da pectina liase; (D) ação da endo-Poligalacturonase; (E) ação da exo-poligalacturonase. Fonte: o autor.

1.2. Produção de pectinases

As preparações enzimáticas pecticas são de grande importância comercial representando cerca de um quarto de toda a produção mundial de enzimas alimentares e 20% do total de enzimas de uso industrial. As pectinases fúngicas estão entre as mais importantes enzimas comerciais e são de grande importância com diversas de aplicações (GOMES et al., 2011; HABRYLO et al., 2018)

Na natureza, os micro-organismos secretam uma série de enzimas para degradar as substâncias não celulósicas da planta. A produção industrial de enzimas pectinolíticas é feita principalmente por fungos filamentosos (WONG et al., 2017), como os do gênero *Aspergillus*, que destacam-se por apresentarem altas atividades do complexo pectinolítico (SANDRI; FONTANA; MOURA, 2015). Diversos estudos utilizaram inúmeras linhagens pertencentes a este gênero: *Aspergillus sojae* (DEMIR; TARI, 2014), *Aspergillus flavus* (ANAND; YADAV; YADAV, 2017), *Aspergillus awamori* (ANURADHA et al., 2014) *Aspergillus carbonarius* (NAKKEERAN et al., 2012), *Aspergillus oryzae* (FONTANA; SILVEIRA, 2012) *Aspergillus niger* (GOMES et al., 2011). No entanto, a produção de pectinases foi limitada a algumas linhagens de micro-organismos, sendo assim, necessário identificar outros micro-organismos produtores de enzimas pecticas (WONG et al., 2017).

Atualmente, tem sido realizados muitos estudos de identificação e isolamento de novos fungos produtores de inúmeras enzimas comerciais com grande poder catalítico oriundos da caatinga nordestina (OLIVEIRA et al., 2013). Tal bioma é localizado na zona semiárida no nordeste brasileiro e ocupa quase um milhão de quilômetros quadrados, onde o clima é seco, com elevadas temperaturas anuais (ROCHA; RUIZ-ESPARZA; FERRARI, 2018; SILVA et al., 2018).

Fungos filamentosos provenientes de regiões com condições extremas, como a caatinga, têm despertado grande interesse, pois a capacidade dos fungos a tolerarem altas e/ou baixas temperaturas, entre outras condições que geralmente são desfavoráveis a vida, indicam a existência espécies com mecanismos adaptativos que podem lidar com consideráveis níveis de *stress* e produzir enzimas com características diferenciadas, as quais são importantes para as mais diferentes aplicações biotecnológicas (OLIVEIRA et al., 2013).

A Coleção de Culturas Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco possui um acervo que

consta de aproximadamente 8.000 culturas de fungos, sendo cerca de 1.300 leveduras e 6.700 fungos filamentosos, todas identificadas ao nível de espécie e mantidas em duplicata em cada método de preservação (em óleo mineral e liofilizado). Incluindo cepas provenientes das mais diversas regiões, incluindo inúmeras cepas da zona semiárida no nordeste brasileiro, como *Aspergillus aculeatus* URM 4953 (SOUZA-MOTTA, 2011).

O *Aspergillus aculeatus* tem-se destacado com um bom produtor de diferentes enzimas como: frutossiltransferase (GHAZI et al., 2007), β -1,4-galactanase (TORPENHOLT et al., 2015), xilanase (DAS; RAY, 2016), β -fructofuranosidase (LORENZONI et al., 2014), endoglucanase (TAKADA et al., 2002), dentre outras. Apesar de atualmente no Brasil existir preparos pectinolíticos de *A. aculeatus* comercializados, como a Pectinex Ultra SP-L (Sigma) (OLIVEIRA et al., 2018), o relato pela literatura ainda é pobre, que impulsiona a pesquisa em torno deste.

A produção de pectinases microbianas pode ser realizada por dois processos distintos denominados fermentação submersa – FS (no qual o meio é completamente líquido) e fermentação em estado sólido – FES (neste o meio é majoritariamente sólido, com uma umidade relativamente baixa). Contudo, o cultivo submerso tem sido mais aplicada industrialmente, cerca de 90% de todas as enzimas industriais são produzidas por esta técnica, devido as inúmeras vantagens que este apresenta sobre o cultivo em estado sólido (SANDRI; FONTANA; MOURA, 2015). As principais vantagens da FS compreendem a capacidade aumento de escala de produção e controle de parâmetros do processo, como pH, temperatura, transferência de oxigênio e umidade (UZUNER; CEKMECELIOGLU, 2015). Além disto, alguns fatores como condições de cultivo, em particular, pela composição do meio de cultura, tipo e concentração da fonte de carbono, pH e temperatura do cultivo, entre outros, influenciam diretamente na produção das enzimas pécicas (CORDEIRO; MARTINS, 2009; ANDRADE et al., 2011)

A inclusão de resíduos agroindustriais na produção das pectinases para uso industriais tem se mostrado bastante promissor, pois são compostos principalmente de carboidratos complexos e proteínas que podem servir como nutrientes para o crescimento microbiano e produção de enzimas. Podendo ser incluídos inúmeros resíduos agroindustriais como: casca de manga, casca de uva, miolo de tamarindo, casca de sapoti, casca de banana, bagaço de maçã, casca de mamão, bagaço de amendoim, bagaço de dendê, casca de romã, farelo de arroz e farelo de trigo (POONDLA et al., 2016). Esses resíduos tem despertado elevado interesse econômico, especialmente no Brasil que possui em abundância resíduos agroindustriais (CASTRO et al., 2015).

1.3. Imobilização

As pectinases apresentam excelentes propriedades catalíticas, contudo, o uso em sua forma solúvel (forma livre) sempre apresenta alguns problemas, como a baixa estabilidade sob condições operacionais intensas, a dificuldade de recuperação da enzima, impossibilidade de múltiplas reutilizações em um processo industrial, apresentando assim baixo custo-benefício. Assim, as técnicas imobilizações enzimáticas têm sido utilizadas para superar esses problemas, bem como, para melhorar suas características catalíticas, tornando-as economicamente viáveis para várias aplicações nos diferentes setores industriais (BIBI et al., 2017).

A imobilização consiste em confinar a enzima dentro de um suporte ou ligá-la a sua superfície, de modo a reter sua atividade permitindo reusos (REHMAN et al., 2016). Geralmente, a imobilização é realizada por três técnicas distintas:

- Adsorção (Fig. 1.2A): consiste em um método simples onde as enzimas são adsorvidas em um suporte sólido por meio de interações eletrostáticas (interações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas). As principais vantagens, deste método, residem na facilidade e simplicidade da técnica e no baixo custo associado a não necessidade de ativação do suporte e na possibilidade de reutilização do suporte após vários ciclos. Além disso, a adsorção promove pouca alteração na estrutura conformacional da enzima, uma vez que a enzima é espontaneamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável. Como desvantagens, tem-se a aleatoriedade da interação enzima-suporte e a possibilidade de dessorção da enzima devido a variações de temperatura, pH e força iônica. Contudo, técnicas foram desenvolvidas a fim de reduzir a dessorção da enzima, como, por exemplo, a modificação química do suporte, a redução do tamanho de seus poros ou a reticulação da enzima no interior dos poros. Outros estudos sugerem que a hidrofobização do suporte pode resultar na redução da lixiviação e melhoria da atividade enzimática (SOUZA et al., 2017; GARCIA-GALAN et al., 2011);
- Ligação covalente (Fig. 1.2B): é necessário a ativação dos suportes com a inserção de grupos reativos que reagem com resíduos de aminoácidos da enzima, ligando-a covalentemente ao suporte sólido. A força dessa ligação é elevada e normalmente envolve vários resíduos da enzima, proporcionando uma grande rigidez na sua estrutura. Essa rigidez pode manter a estrutura da enzima inalterada perante agentes desnaturantes como calor, solventes orgânicos, pH extremos e outros. Dentre os métodos de imobilização

disponíveis, a ligação covalente é o mais efetivo em termos de estabilização térmica e operacional das enzimas. Geralmente, o glutaraldeído é um dos reagentes mais empregados na ativação de suportes, devido à simplicidade dos métodos de ativação e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis. As principais vantagens desse método residem em maior resistência do biocatalisador quanto à variação de pH, temperatura e incubação em solventes orgânicos e o fato de a enzima não ser desorvida do suporte. Inconvenientes da técnica estão relacionados à parcial inativação e/ou redução da atividade catalítica da enzima devido à alteração em sua conformação nativa impostas pelas ligações entre as enzimas e os grupos reativos do suporte (SOUZA et al., 2017; MENDES et al., 2011);

- Encapsulação (Fig. 1.2C): envolve a polimerização *in situ* da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados. Nesse processo, a enzima é incorporada como parte da mistura reativa a ser polimerizada. À medida que a polimerização prossegue, a matriz polimérica se forma em torno da enzima, confinando-a em sua estrutura. O método de encapsulação é baseado na inclusão das proteínas em estruturas poliméricas com tamanho de poros que permite a difusão dos substratos e produtos e bloqueia a passagem da proteína. A vantagem da utilização desse método é que o confinamento protege a enzima do contato direto com o meio reacional, minimizando, assim, os efeitos de inativação, por exemplo, por solventes orgânicos. Além disso, esse é o método de imobilização mais fácil de proceder e pode ser empregado para imobilizar um ou mais tipos de proteína com qualquer grau de purificação, além de não promover alterações estruturais nestas. Como desvantagens, têm-se as dificuldades associadas, como o controle do tamanho dos poros do suporte, a desorção da enzima devido aos diferentes tamanhos de poros e inconvenientes de limitações de transferência de massa e difusão dos substratos pelos poros da matriz (SOUZA et al., 2017).

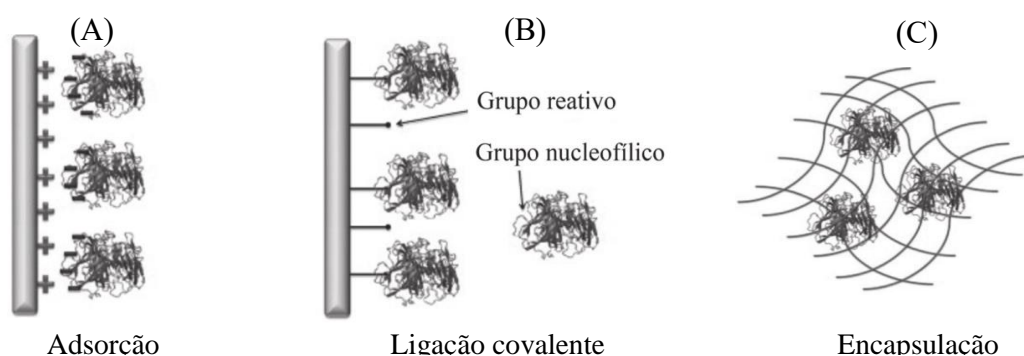


Fig. 1.2. Diferentes técnicas de imobilização enzimática. (A) imobilização por adsorção; (B) imobilização por ligação covalente; (C) imobilização por encapsulação. Adaptado de (SOUZA et al., 2017).

O suporte a ser utilizado na imobilização é de grande importância, por promover a maior contribuição para o bom desempenho da enzima imobilizada (MENDES et al., 2011). Os polímeros, sintéticos ou naturais, representam uma classe de grande importância para a imobilização de enzimas. Um polímero bastante utilizado e reportado pela literatura para imobilização de enzimas é o alginato de cálcio, sendo suas esferas de alginato de cálcio um dos suportes mais potentes quando comparados a outros materiais utilizados nesta tecnologia (REHMAN et al., 2013).

O alginato é um polissacarídeo aniônico encontrado nas paredes celulares de algas marrons, formado por unidades de ácido manurômico ligados a unidades de ácido galacturônico (KONDAVEETI et al., 2018). Devido a suas características excepcionais, como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, capacidade de quelar íons de cálcio, baixo custo, elevada disponibilidade e resistência a contaminação microbiana. O alginato representa um dos polímeros de maior aplicabilidade nos mais diversos setores, desde a da tecnologia de alimentos a indústria farmacêutica (REHMAN et al., 2013; VUEVA et al., 2018).

1.4. Cinética enzimática

Estudos cinéticos são uma ferramenta poderosa na investigação dos mecanismos de reações, permitindo conferir detalhes importantes dos processos que antecedem a etapa determinante da velocidade. Através de um estudo cinético pode-se determinar a lei de velocidade de uma reação, bem como a sua constante de velocidade (OLIVEIRA; FARIA, 2010).

Atualmente o modelo de Michaelis-Menten (Eq. 1) é a pedra angular da bioquímica, e descreve a taxa de conversão de um substrato ao seu produto em uma reação catalisada por enzima. Sua representação gráfica consiste em uma hipérbole, que em determinado ponto (indicado pela velocidade máxima) representa a saturação enzimática, refletindo o fato de que enzimas envolvidas na reação estão indisponíveis para outras moléculas de substrato. Uma vez saturado, o substrato adicional não é mais capaz de aumentar a taxa de reação (VAN DYKEN, 2017).

$$v = \frac{V_{max}[S]}{k_M + [S]} \quad (\text{Eq. 1})$$

Contudo nem todas as enzimas apresentam um comportamento cinético descrito por Michaelis-Menten, estas apresentam um gráfico velocidade de reação versus concentração de substrato como uma curva de saturação sigmóide, caracterizando assim enzimas alóstericas. Este tipo de cinética enzimática, geralmente, é uma resposta de interações cooperativas entre as subunidades, conhecida como cooperatividade alósterica. Neste fenômeno a interação enzima-substrato promove mudanças nas subunidades proteicas, com a conseqüente mudança conformacional da proteína (KOSHLAND; HAMADANI, 2002; NELSON; COX, 2002).

Usualmente a cooperatividade alósterica, segue o modelo de Hill de Hill (Eq. 2) e é medida pelo número de Hill (n), o que indica o desvio em relação ao modelo de Michaelis-Menten. Quando n é igual a 1 a interação enzima-substrato é não cooperativa; n menor que 1, indica cooperatividade negativa; se n maior que 1, a cooperatividade é positiva (RICARD; CORNISH-BOWDEN, 1987).

$$v = \frac{V_{max}[S]^n}{k_{0.5}^n + [S]^n} \quad (\text{Eq. 2})$$

As reações com cooperatividade positiva são as de maior interesse (Fig. 1.3). Nesta, presume-se que a enzima possui múltiplos sítios de ligação, contudo nem todos estão naturalmente disponíveis. A ligação da primeira molécula de substrato (S1) proporciona alterações estruturais e/ou elétricas na enzima, o que altera a afinidade desta última, permitindo a ligação de outras moléculas de substrato (S2) nos sítios ativos agora disponíveis (NINGA et al., 2018).

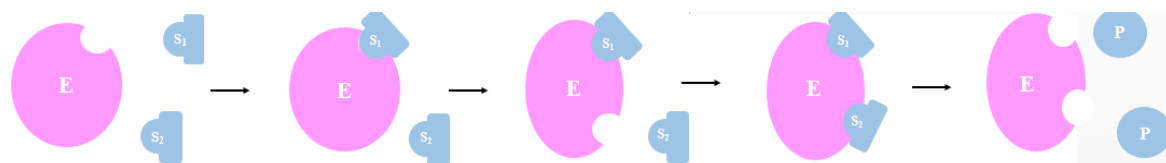


Fig. 1.3. Mecanismo reacional apresentado por enzimas que exibem cooperatividade positiva. E, enzima; S₁e S₂, substratos; P, Produto. Fonte: o autor.

1.5. Termodinâmica enzimática

A importância de entender a termodinâmica de reações bioquímicas foi descrita em 1957, o que impulsionou a pesquisa em torno de parâmetros termodinâmicos das mais diferentes enzimas. Estes dados desempenham um papel essencial na previsão do

comportamento reacional e entendimento do estado de equilíbrio, para qualquer que seja o sistema em que reações catalisadas por enzimas ocorram. O conhecimento dessas informações termodinâmicas influencia diretamente nas aplicações enzimáticas, tanto nos mais diversos ramos da bioquímica, quanto na enzimologia industrial, permitindo que engenheiros otimizem o rendimento de produtos, bem como estimem requisitos energéticos para processos e reações (GOLDBERG; TEWARI; BHAT, 2004).

A termodinâmica é um dos ramos da física com ampla aplicação na bioquímica, assim parâmetros como entropia, entalpia e energia livre são pilares da compreensão de vários processos biológicos, principalmente, no fenômeno de desnaturação proteica (QIAN; BEARD, 2005).

Como as pectinases são aplicadas na indústria de processamento de alimentos o estudo de sua estabilidade térmica é importante, pois a desativação térmica, a qual modifica a estrutura proteica de uma forma nativa e funcional para uma forma inativada, representa uma restrição importante em muitos processos biotecnológicos. Assim, o estudo termodinâmico é capaz de auxiliar o entendimento do mecanismo de inativação enzimática (NAIDU; PANDA, 2003). Em adição, a análise termodinâmica permite a determinação de parâmetros de ativação da reação enzimática, o que dá uma ideia da funcionalidade da enzima em relação a seu substrato específico, possibilitando a compreensão da eficiência de formação do complexo enzima-substrato, bem como da espontaneidade de formação dos produtos (MAISURIA; NERURKAR, 2012).

1.6. Processamento de sucos de frutas

As pectinases apresentam um papel muito importante em diversos setores industriais, sendo utilizadas no processamento de vinhos, maceração de frutas e vegetais, processamento de sucos, extração de óleos vegetais, fermentação de café e chá, tratamento de água residuais (HABRYLO et al., 2018).

A presença de algumas substâncias, como as pectinas, promove elevada turbidez do suco e a presença de sedimentos no fundo da garrafa durante o armazenamento, o que muitas vezes é confundido como deterioração do produto (LACHOWICZ; OSZMIAŃSKI; KALISZ, 2018). O processo de clarificação de sucos de frutas, para a eliminação de tais substâncias, torna-se imprescindível, melhorando sua aparência e comercialização. Os métodos convencionais envolvem a filtração e clarificação, contudo

estes processos podem levar a perda de algumas substâncias, como compostos fenólicos de atividade antioxidante. Uma abordagem alternativa é realizar a despectinização pelo uso das enzimas pectinolítica, visando aumentar a clareza dos sucos de frutas e evitando os problemas dos métodos convencionais (CERRETI et al., 2017). Além disto, o uso de pectinases no processo de clarificação possibilita uma redução na viscosidade do suco, o que reduz o tempo e o custo de outros processos, bem como, sucos mais concentrados, com melhor sabor, cor e rendimento (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

O processo de hidrólise das pectinas em sucos é influenciado por vários fatores, que incluem, concentração enzimática, tempo de incubação e temperatura. Sendo, na maioria dos casos, o um fator de importância diminuta, pois a hidrólise é feita no pH natural da fruta que compõe o suco. O conhecimento da influência destes parâmetros, bem como, a cinética enzimática de hidrólise das pectinas, apresenta grande importância para fins industriais (NINGA et al., 2018).

1.7. Caju (*Anacardium occidentale L.*)

O *Anacardium occidentale L.* pertence à família Anacardiaceae, conhecido como cajueiro, é uma planta nativa do Norte e Nordeste do Brasil, devido a presença de flavanóides e taninos em sua composição química que possui importante ação biológica. Entre os benefícios a saúde mais relatados estão: efeitos anti-inflamatórios, cicatrizantes, antibacterianos e hemostáticos (ARAÚJO et al., 2018). Seu pedúnculo, o caju, é uma excelente fonte de compostos bioativos: como vitaminas, minerais e compostos fenólicos, que lhe conferem elevado potencial antioxidante. O consumo do caju é realizado *in natura* ou na forma de produtos processados de alto valor agregado como o suco (KAPRASOB et al., 2017).

O suco de caju é bastante popular no Brasil tendo uma produção anual de 44 milhões de litros, apenas superada pelos sucos concentrados de laranja e uva. No entanto, o setor pode crescer consideravelmente, já que das 1,8 milhões de toneladas de caju processados anualmente, para obter a castanha de caju, mais de 80% são descartados como resíduos agroindustriais, devido ao maior valor comercial que a castanha possui. Assim, a crescente demanda pelo suco de caju concentrado tem impulsionado a pesquisa em torno do seu processo tecnológico, afim de obter produtos de maior qualidade (BIASOTO et al., 2015).

REFERÊNCIAS

ANAND, G.; YADAV, S.; YADAV, D. Purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus flavus* MTCC 7589. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 264–269, 2017.

ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; LADEIRA, S. A.; MARTINS, M. L. L. Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 204–208, 2011.

ANURADHA, K.; PADMA, P. N.; VENKATESHWAR, S.; REDDY, G. Fungal isolates from natural pectic substrates for polygalacturonase and multienzyme production. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 339–344, 2010.

ANURADHA, K.; PADMA, P. N.; VENKATESHWAR, S.; REDDY, G. Effect of physical factors on pellet morphology of *Aspergillus awamori* MTCC 9166 and polygalacturonase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 271–274, 2014.

ARAÚJO, J. S. C.; CASTILHO, A. R. F.; LIRA, A. B.; PEREIRA, A. V.; AZEVÊDO, T. K. B.; BRITO COSTA, E. M. de M.; PEREIRA, M. do S. V.; PESSOA, H. F. L.; PEREIRA, J. V. Antibacterial activity against cariogenic bacteria and cytotoxic and genotoxic potential of *Anacardium occidentale* L. and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan extracts. **Archives of Oral Biology**, v. 85, p. 113–119, 2018.

BIASOTO, A. C. T.; SAMPAIO, K. de L.; MARQUES, E. J. N.; SILVA, M. A. A. P. Dynamics of the loss and emergence of volatile compounds during the concentration of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.) and the impact on juice sensory quality. **Food Research International**, v. 69, p. 224–234, 2015.

BIBI, F.; IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; BHATTI, K. H.; RAZA, A. Improved catalytic functionalities of purified pristine and chitosan-immobilized polygalacturonase, and pectin lyase. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 128, p. 146–154, 2017.

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGAGLI, M. P.; DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 678–684, 2015.

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

COBS-ROSAS, M.; CONCHA-OLMOS, J.; WEINSTEIN-OPPENHEIMER, C.; ZÚÑIGA-HANSEN, M. E. Assessment of antiproliferative activity of pectic substances obtained by different extraction methods from rapeseed cake on cancer cell lines. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 923–932, 2015.

CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L. Produção de poligalacturonase, pelo termofílico *Bacillus* sp. e algumas de suas propriedades Production of a polygalacturonase, by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzyme. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 135–141, 2009.

DAS, A.; RAY, L. Production of crude xylanase using a isolated fungal strain *Aspergillus* sp. S6 by solid state fermentation. **Materials Today: Proceedings**, v. 3, p. 3343–3360, 2016.

DEMIR, H.; TARI, C. Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillus sojae*. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 302–309, 2014.

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, p. 591–595.

EL-LOLY, M.; AWAD, A.; MANSOUR, A. Thermal Kinetics Denaturation of Buffalo Milk Immunoglobulins. **International Journal of Dairy Science**, v. 2, p. 292–302, 2007.

EVANGELISTA, D. E.; DE ARAÚJO, E. A.; NETO, M. O.; KADOWAKI, M. A. S.; POLIKARPOV, I. Biochemical characterization and low-resolution SAXS structure of an exo-polygalacturonase from *Bacillus licheniformis*. **New Biotechnology**, v. 40, p. 268–274, 2018.

FARAVASH, R. S.; ASHTIANI, F. Z. The influence of acid volume, ethanol-to-extract ratio and acid-washing time on the yield of pectic substances extraction from peach pomace. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 196–202, 2008.

FONTANA, R. C.; SILVEIRA, M. M. Production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae* in stirred tank and internal and external loop airlift reactors. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 157–163, 2012.

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, p. 2885–2904, 2011.

GHAZI, I.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; GARCIA-ARELLANO, H.; FERRER, M.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J. Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 204–211, 2007.

GOLDBERG, R. N.; TEWARI, Y. B.; BHAT, T. N. Thermodynamics of enzyme-catalyzed reactions - A database for quantitative biochemistry. **Bioinformatics**, v. 20, p. 2874–2877, 2004.

GOMES, J.; ZENI, J.; CENCE, K.; TONIAZZO, G.; TREICHEL, H.; VALDUGA, E. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillus niger* ATCC 9642. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 281–287, 2011.

HABRYLO, O.; EVANGELISTA, D. E.; CASTILHO, P. V.; PELLOUX, J.; HENRIQUE-SILVA, F. The pectinases from *Sphenophorus levis*: Potential for biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 112, p. 499–508, 2018.

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

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

KAPRASOB, R.; KERDCHOECHUEN, O.; LAOHAKUNJIT, N.; SARKAR, D.; SHETTY, K. Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, v. 59, p. 141–149, 2017.

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

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

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

KONDAVEETI, S.; VINICIUS, P.; BUENO, D. A.; CARMONA-RIBEIRO, A. M.; ESPOSITO, F.; LINCOPAN, N.; RITA, M.; FREITAS, D.; PETRI, S. Microbicidal gentamicin-alginate hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, p. 159–167, 2018.

KOSHLAND, D. E.; HAMADANI, K. Proteomics and models for enzyme cooperativity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 46841–46844, 2002.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126–139, 2004.

LACHOWICZ, S.; OSZMIANŃSKI, J.; KALISZ, S. Effects of various polysaccharide clarification agents and reaction time on content of polyphenolic compound, antioxidant activity, turbidity and colour of chokeberry juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, p. 347–360, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LI, Y.; WANG, Y.; TU, T.; ZHANG, D.; MA, R.; YOU, S.; WANG, X.; YAO, B.; LUO, H.; XU, B. Two acidic, thermophilic GH28 polygalacturonases from *Talaromyces*

leycettanus JCM 12802 with application potentials for grape juice clarification. **Food Chemistry**, v. 237, p. 997–1003, 2017.

LIU, Z. M.; LU, Z. X.; LV, F. X.; BIE, X. M.; ZHAO, H. Z. Heterologous expression and purification of protopectinase-N from *Bacillus subtilis* in *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 975–979, 2006.

LORENZONI, A. S.; AYDOS, L. F.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized beta-fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Carbohydrate Polymers*, v. 103, p. 193–197, 2014.

MAISURIA, V. B.; NERURKAR, A. S. Biochemical properties and thermal behavior of pectate lyase produced by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* BR1 with industrial potentials. **Biochemical Engineering Journal**, v. 63, p. 22–30, 2012.

MARTOS, M. A.; BUTIUK, A. P.; ROJAS, N. L.; HOURS, R. A. Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Wickerhamomyces anomalus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 587–594, 2014.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. D. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831–840, 2011.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 57–67, 2003.

NAKKEERAN, E.; GOWTHAMAN, M. K.; UMESH-KUMAR, S.; SUBRAMANIAN, R. Techno-economic analysis of processes for *Aspergillus carbonarius* polygalacturonase production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, p. 634–640, 2012.

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

NINGA, K. A.; SENGUPTA, S.; JAIN, A.; DESOBGO, Z. S. C.; NSO, E. J.; DE, S. Kinetics of enzymatic hydrolysis of pectinaceous matter in guava juice. **Journal of Food Engineering**, v. 221, p. 158–166, 2018.

NOREEN, A.; NAZLI, Z. i. H.; AKRAM, J.; RASUL, I.; MANSHA, A.; YAQOUB, N.; IQBAL, R.; TABASUM, S.; ZUBER, M.; ZIA, K. M. Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 254–272, 2017.

OLIVEIRA, A. P.; FARIA, R. B. Ordens não inteiras em cinética química. **Química Nova**, v. 33, p. 1412–1415, 2010.

OLIVEIRA, L. G.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 95, p. 49–54, 2013.

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

OZUNA, C. V.; BARRO, F. Safety evaluation of transgenic low-gliadin wheat in Sprague Dawley rats: An alternative to the gluten free diet with no subchronic adverse effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 176–185, 2017.

PALLA, C. A.; PACHECO, C.; CARRÍN, M. E. Preparation and modification of chitosan particles for *Rhizomucor miehei* lipase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, p. 199–207, 2011.

PETKOVA, G. A.; ZÁRUBA, K.; KRÁL, V. Synthesis of silica particles and their application as supports for alcohol dehydrogenases and cofactor immobilizations: Conformational changes that lead to switch in enzyme stereoselectivity. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1824, p. 792–801, 2012.

POONDLA, V.; YANNAM, S. K.; GUMMADI, S. N.; SUBRAMANYAM, R.; REDDY OBULAM, V. S. Enhanced production of pectinase by *Saccharomyces cerevisiae* isolate using fruit and agro-industrial wastes: Its application in fruit and fiber processing. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 40–50, 2016.

QIAN, H.; BEARD, D. A. Thermodynamics of stoichiometric biochemical networks in living systems far from equilibrium. **Biophysical Chemistry**, v. 114, p. 213–220, 2005.
RAJULAPATI, V.; SHARMA, K.; DHILLON, A.; GOYAL, A. SAXS and homology modelling based structure characterization of pectin methylesterase a family 8 carbohydrate esterase from *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 641, p. 39–49, 2018.

REHMAN, H. U.; AMAN, A.; NAWAZ, M. A.; KARIM, A.; GHANI, M.; BALOCH, A. H.; QADER, S. A. U. Immobilization of pectin depolymerising polygalacturonase using different polymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 127–133, 2016.

REHMAN, H. U.; AMAN, A.; SILIPO, A.; QADER, S. A. U.; MOLINARO, A.; ANSARI, A. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. **Food Chemistry**, v. 139, p. 1081–1086, 2013.

RICARD, J.; CORNISH-BOWDEN, A. Co-operative effects and allosteric enzymes: 20 years on. **European Journal of Biochemistry**, v. 166, p. 255–272, 1987.

ROCHA, P. A.; RUIZ-ESPARZA, J.; FERRARI, S. F. Differences in the structure of the bat community between a cloud forest refuge and a surrounding semi-arid Caatinga scrubland in the northeastern Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 151, p. 41–48, 2018.

S. PEREIRA, G.; CIPRIANI, M.; ELISABETH, W.; SOUZA, O.; O. STRAPAZZON, J.; GERN, R. Onion juice waste for production of *Pleurotus sajor-caju* and pectinases. **Food and Bioproducts Processing**, v. 106, 2017.

SANDRI, I. G.; FONTANA, R. C.; MOURA, M. S. Influence of pH and temperature on the production of polygalacturonases by *Aspergillus fumigatus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 430–436, 2015.

SILVA, U. B. T.; DELGADO-JARAMILLO, M.; SOUZA AGUIAR, L. M.; BERNARD, E. Species richness, geographic distribution, pressures, and threats to bats in the Caatinga drylands of Brazil. **Biological Conservation**, v. 221, p. 312–322, 2018.

SOUZA, L.; VERÍSSIMO, L. A.; PESSELA, B.; MATOS SANTORO, M.; R. RESENDE, R.; MENDES, A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: RESENDE, R. R. *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4*. São Paulo: **Blucher**, 2017. p. 529–568.

SOUZA, R. L. a.; OLIVEIRA, L. D. S. C.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 987–992, 2010.

SOUZA-MOTTA, C. M. Micoteca URM. Estudos universitários. **Revista de cultura**, v. 27, p. 167–169, 2011.

SPAGNA, G.; BARBAGALLO, R. N.; INGALLINERA, B. A specific method for determination of pectin esterase in blood oranges. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 174–177, 2003.

TAKADA, G.; KAWASAKI, M.; KITAWAKI, M.; KAWAGUCHI, T.; SUMITANI, J.-I.; IZUMORI, K.; ARAI, M. Cloning and Transcription Analysis of the *Aspergillus aculeatus* No. F-50 Endoglucanase 2 (cmc2) Gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, p. 482–485, 2002.

TORPENHOLT, S.; DE MARIA, L.; OLSSON, M. H. M.; CHRISTENSEN, L. H.; SKJØT, M.; WESTH, P.; JENSEN, J. H.; LO LEGGIO, L. Effect of mutations on the thermostability of *Aspergillus aculeatus* β -1,4-galactanase. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 256–264, 2015.

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

UZUNER, S.; CEKMECELIOGLU, D. Enhanced pectinase production by optimizing fermentation conditions of *Bacillus subtilis* growing on hazelnut shell hydrolyzate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 113, p. 62–67, 2015.

VAN DYKEN, J. D. Noise slows the rate of Michaelis–Menten reactions. **Journal of Theoretical Biology**, v. 430, p. 21–31, 2017.

VUEVA, Y.; CONNELL, L. S.; CHAYANUN, S.; WANG, D.; MCPHAIL, D. S.; ROMER, F.; HANNA, J. V.; JONES, J. R. Silica/alginate hybrid biomaterials and assessment of their covalent coupling. **Applied Materials Today**, v. 11, p. 1–12, 2018.

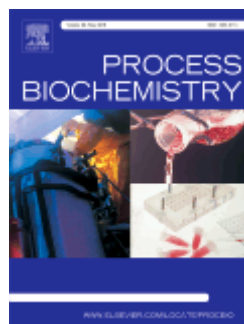
WONG, L. Y.; SAAD, W. Z.; MOHAMAD, R.; TAHIR, P. M. Optimization of cultural conditions for polygalacturonase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* R6 capable of retting kenaf. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 175–183, 2017.

XIA, J.; LI, P. Pectic Enzymes. In: Reference Module in Food Science. **Elsevier**, 2018.
YAPO, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins - A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 373–385, 2011.

YUAN, P.; MENG, K.; HUANG, H.; SHI, P.; LUO, H.; YANG, P.; YAO, B. A novel acidic and low-temperature-active endo-polygalacturonase from *Penicillium* sp. CGMCC 1669 with potential for application in apple juice clarification. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1369–1375, 2011.

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E TERMODINÂMICA DE UMA NOVA POLIGALACTURONASE DE *Aspergillus aculeatus* URM4953: COMPARAÇÃO DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA EM ALGINATO DE CÁLCIO



Artigo publicado no Journal of Process Biochemistry em 21 de julho 2018

ISSN: 1359-5113

doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.010

Fator de impacto: 2,616

Qualis: A1 (Ciências de alimentos)

Caracterização cinética e termodinâmica de uma nova poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953: comparação da enzima livre e imobilizada em alginato de cálcio

Kinetic and thermodynamic characterization of a novel *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonase. Comparison of free and calcium alginate-immobilized enzyme

Jônatas de Carvalho Silva^{a#}, Pedro Renann Lopes de França^{b#}, Attilio Converti^c, Tatiana Souza Porto^{a,b*}

^aRede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil, 52171-900

^bUniversidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade acadêmica de Granhuns, Avenida Bom Pastor, s/n - Boa Vista, Garanhuns, Pernambuco, Brazil, 55292-270

^cDepartamento de Engenharia Civil, Química e Ambiental, Pólo de Engenharia Química, Universidade de Gênova, via Opera Pia 15, Gênova, Itália, 16145

[#]Contribuiu igualmente para o artigo

RESUMO

A poligalacturonase (EC 3.2.1.15) (PG) de *Aspergillus aculeatus* URM4953 foi imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio usando glutaraldeído como agente de ligamento. As condições de imobilização foram otimizadas por um planejamento central composto, em que a concentração de glutaraldeído e o tempo de imobilização foram escolhidos como variáveis independentes. Apenas o tempo influenciou significativamente a imobilização de PG, cujo maior rendimento (95%) foi obtido usando 0,2 M de glutaraldeído durante 45 min. A PG, caracterizada em termos dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos, apresentou o mesmo perfil de pH nas formas livre e imobilizada, com dois valores ótimos de pH sob condição ácida (4,0) e neutra (7,0). Embora diminuindo a temperatura ótima da PG de 50 para 40°C, a imobilização não influenciou a estabilidade da enzima na faixa de 30 a 40°C, preservando mais de 90% de sua atividade inicial após 60 min. Os parâmetros cinéticos da PG imobilizada revelaram a maior afinidade pela pectina do que a PG livre, que, no entanto, foi ligeiramente mais eficiente na degradação da pectina. Os parâmetros termodinâmicos de termoinativação da PG imobilizada sugeriram um predominante mecanismo de reversível desdobramento, que foi responsável pela sensibilidade mais baixa ao aquecimento do que a PG livre e permitiu quatro ciclos sucessivos de uso da enzima imobilizada com apenas 34% de perda de atividade. A PG imobilizada mostrou desempenho e características satisfatórias, bem como grande potencial para futuras aplicações industriais.

Palavras-chave: Imobilização; Poligalacturonase; *Aspergillus aculeatus* URM4953; Termodinâmica; Cinética.

ABSTRACT

A polygalacturonase (EC 3.2.1.15) (PG) from *Aspergillus aculeatus* URM4953 was covalently immobilized on calcium alginate beads using glutaraldehyde as a cross-linking agent. The immobilization conditions were optimized by a central composite design, where glutaraldehyde concentration and immobilization time were chosen as the independent variables. Only the time influenced significantly PG immobilization, whose highest yield (95%) was obtained using 0.2 M glutaraldehyde after 45 min. PG, characterized in terms of kinetic and thermodynamic parameters, displayed the same pH profile in free and immobilized forms, with two optimum pH values under acidic (4.0) and neutral (7.0) conditions. Although lowering the PG optimum temperature from 50 to 40°C, the immobilization did not influence the enzyme stability in the range 30-40°C, preserving more than 90% of its initial activity after 60 min. The kinetics parameters of immobilized PG revealed higher affinity for pectin than free PG, which nonetheless was slightly more efficient in pectin degradation. The thermodynamic parameters of immobilized PG thermoinactivation suggested a predominating mechanism of reversible unfolding, which was responsible for lower sensitivity to heating than free PG and allowed four successive cycles of immobilized enzyme utilization with only 34% of activity loss. Immobilized PG showed satisfactory performance and features as well as great potential for future industrial applications.

Keywords: immobilization, polygalacturonase, *Aspergillus aculeatus* URM4953, thermodynamics, kinetics.

2.1. Introdução

As poligalacturonases são as enzimas mais importantes na degradação da pectina, um biopolímero complexo constituído de moléculas longas, que está presente na lâmina média e nas paredes celulares primárias das células vegetais jovens (KOZIOŁ et al., 2017). Estas atuam na principal cadeia polimérica, do carboidrato, quebrando as ligações glicosídicas α -1,4 (hidrolases) entre os ácidos galacturônicos por dois mecanismos. As exo-poligalacturonases (EC 3.2.1.15) catalisam a hidrólise de ligações a partir da extremidade não redutora da cadeia pectínica, liberando monômeros de ácido galacturônico, enquanto que as endo-poligalacturonases (EC 3.2.1.67) agem clivando aleatoriamente as ligações glicosídicas α -1,4, apresentando uma ação radial na estrutura da pectina, liberando ácidos oligo-galacturônicos (KASHYAP et al., 2001; KOZIOŁ et al., 2017).

Suas aplicações abrangem diversos setores industriais, como extração e clarificação de vinhos e sucos de frutas (SIEIRO et al., 2012; CERRETI et al., 2017), maceração de frutos (JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005), redução de viscosidade de sucos (SANDRI et al., 2011), extração de óleos vegetais (CHEN et al., 2018), fermentação de café e chá (UENOJO; PASTORE, 2007), degomagem de fibras (HABRYLO et al., 2018), fabricação de papel (KOHLI; GUPTA, 2015) e no tratamento de águas residuais (MAHESH et al., 2016).

Apesar de serem produzidas industrialmente por micro-organismos como fungos filamentosos, bactérias e leveduras, as PGs podem ser encontradas em plantas superiores (KOHLI; GUPTA, 2015), insetos e protozoários (AMIN et al., 2017) e alguns nematóides fito-parasitários (RAI et al., 2015). Quando estas enzimas são produzidas por microorganismos, o extrato bruto contém muitos contaminantes. Assim, o isolamento, a purificação (principalmente por ultrafiltração, precipitação e cromatografia por afinidade) e caracterização bioquímica das PGs das diversas fontes têm sido realizadas ao longo dos anos com ênfase em seu potencial para diferentes aplicações industriais. No entanto, alguns desses métodos são complicados, trabalhosos, demorados e caros. Além disso, a enzima livre não pode ser recuperada após múltiplos usos (MENDES et al., 2011). Então, técnicas que permitem uma separação parcial dos contaminantes e várias reutilizações do biocatalizador, facilitam a sua aplicação e permitem a redução de custos nos processos industriais.

A imobilização enzimática é uma técnica amplamente utilizada capaz de garantir simultaneamente estas características, podendo ser realizada pela adsorção, ligação covalente ou encapsulamento (PETKOVA; ZÁRUBA; KRÁL, 2012). Entretanto, alguns fatores podem afetar a atividade enzimática na imobilização; portanto, fatores como o modo de ligação, agregação de proteínas, microambiente, partição, difusão, mudanças conformacionais e indução, polarização molecular, agentes de ligação cruzada e flexibilidade estrutural devem ser considerados (SMITH et al., 1996). Dentre as vantagens deste processo tem-se: aumento da atividade enzimática, fácil recuperação de enzimas e/ou produtos após centrifugação ou filtração, múltiplos reuso, heterogeneidade do sistema, rápida interrupção das reações, operação contínua e redução de perdas do processo (MA et al., 2017).

Vários suportes podem ser utilizados para imobilização enzimática. Estes suportes devem ter algumas características como geometria interna e superficial adequada, grau de ativação simples, resistência mecânica, etc. (SANTOS et al., 2015). Dentre eles, o alginato, um polissacarídeo natural e biodegradável, é um suporte amplamente utilizado devido principalmente à sua boa biocompatibilidade, baixo custo, fácil disponibilidade e simples preparo (ZHOU; LI; LI, 2010). Este suporte tem sido usado para imobilização de pectinases fúngicas para clarificação de suco principalmente em reatores de leito fixo (OLIVEIRA et al., 2018a). As técnicas de imobilização usando alginato de cálcio são conhecidas por serem relativamente simples e robustas, com grande valor econômico para aplicações (BILAL et al., 2017).

A caracterização bioquímica de enzimas é necessária para avaliar seu potencial biotecnológico (CASTRO et al., 2015), para obter informações relevantes em aplicações industriais a fim de preservar sua atividade por um longo período de tempo (SOUZA et al., 2010; KOHLI; GUPTA, 2015). Entre as informações mais importantes das enzimas estão seus parâmetros cinéticos e termodinâmicos, cujo o uso combinado permite através de ferramentas matemáticas corretas prever seu comportamento sob condições não testadas experimentalmente (EL-LOLY; AWAD; MANSOUR, 2007).

Baseado nisto, o presente trabalho objetivou otimizar a imobilização por ligação covalente da poligalacturonase do *Aspergillus aculeatus* URM4953 em pérolas de alginato de cálcio e comparar os parâmetros bioquímicos, cinéticos e termodinâmicos da enzima livre e imobilizada.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 *Micro-organismo*

Aspergillus aculeatus URM4953 foi obtido da micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. Ele foi mantido em óleo mineral e reativado em solução nutritiva contendo 1% de peptona, 2% de glicose e 0,3% de extrato de levedura. O crescimento ocorreu a 30°C sob agitação de 120 rpm por 72 h. Amostras do fungo foram coletadas e transferidas para frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo meio de cultura Czapek e incubados a 30°C por 7 dias para esporulação. Por fim, os esporos foram coletados com a adição de 3,0 mL de solução salina (0,9% de NaCl e 0,01% de Tween 80) previamente esterilizada. A concentração de esporos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

2.2.2 *Produção de poligalacturonase por fermentação submersa (FS)*

A poligalacturonase (EC 3.2.1.15) (PG) foi produzida pelo *A. aculeatus* URM4953 em fermentação submersa utilizando farinha de casca de maracujá segundo método de Fontana, Polidoro, e Silveira (2009). Uma suspensão a 3% de farinha de casca de maracujá em água deionizada foi autoclavada por 20 min a 121°C e 1 atm para extrair a pectina e açúcares redutores presente na farinha. Após extração, a mistura foi filtrada para remover os sólidos suspensos. Em seguida, sais (0,7 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,8 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 5 mM de K_2HPO_4) e 10 mg/mL de extrato de levedura foram adicionados ao sobrenadante. O meio foi novamente esterilizado em autoclave e inoculado com uma concentração de 10^5 esporos/mL. As fermentações foram realizadas a 30°C em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio, sob agitação de 130 rpm durante 96 h. O fermentado foi filtrado e centrifugado durante 5 min a 4000 rpm. O sobrenadante, denominado extrato bruto enzimático, foi coletado e armazenado sob congelamento (-20°C).

2.2.3 *Atividade enzimática*

A atividade da poligalacturonase foi determinada pelo método proposto por Miller (1959). Neste, 500 µl do extrato bruto (para a PG livre) ou 500 µg de pérolas de

alginate (para a PG imobilizada) foram incubados com 500 μL de pectina cítrica (10 mg/mL) em tampão acetato pH 4,5 a 50°C por 40 min. Uma alíquota de 100 μL foi coletada e misturada com 1,0 mL do reagente DNSA, uma solução constituída por ácido 3,5-dinitrosalicílico a 1,0% , NaOH a 0,4 M e $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 30% . A mistura foi mantida sob ebulição durante 5 min e arrefecida em banho de gelo. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro UV-Vis, modelo SP-1105, (Spectrum, Curitiba, Brasil), a 540 nm contra o branco. Os dados foram plotados em uma curva padrão ($y = 0,0788x + 0,0131$ e $R^2 = 0,9997$) de densidade óptica versus concentração de ácido α -D-galacturônico como açúcar redutor. Uma unidade de atividade da PG foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácido galacturônico por minuto ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$).

2.2.4 Otimização da imobilização da poligalacturonase por ligação covalente em pérolas de alginato de cálcio

A imobilização da PG foi realizada utilizando o alginato de cálcio como suporte e o glutaraldeído como agente de ligamento. Um planejamento composto central (PCC) foi empregado para estudar o efeito combinado de duas variáveis independentes, a concentração de glutaraldeído (0,16; 0,20; 0,30; 0,40; e 0,44 M) e tempo de imobilização da PG (8,8; 15; 30; 45 e 51,2 min), que foram codificados como x e y, respectivamente. Para a síntese das pérolas uma solução de alginato a 0,09 M foi lentamente gotejada em uma solução de cloreto de cálcio (0,3 M) sob agitação. As pérolas formadas foram endurecidas em uma solução de CaCl_2 durante 30 min a 4°C e lavadas com água destilada. Para a obtenção de grupos reativos, as pérolas de alginato de cálcio foram submersas em soluções de glutaraldeído com diferentes concentrações por 2 horas a 28°C e agitadas a 120 rpm. As pérolas ativadas, foram lavadas com água destilada e a remoção completa do glutaraldeído foi verificada por espectrofotometria UV-Vis a 245 nm. Em seguida, elas foram adicionadas ao extrato bruto (com uma concentração de proteína 0,011 mg/mL) por diferentes tempos a 28°C e 120 rpm. Posteriormente, foram lavadas, secas e condicionadas a 4°C. Um total de 11 combinações foram realizadas aleatoriamente de acordo com a configuração do PCC (Tabela 2.1), escolhendo o rendimento (Y) como variável resposta, que foi calculado como a razão entre a atividade da PG imobilizada e a atividade do extrato bruto (enzima livre) e expresso em porcentagem. A concentração de proteína imobilizada foi determinada pelo método de Bradford (1976), definida assim

como a diferença de concentração de proteína na solução do extrato bruto antes e depois da imobilização. O modelo de regressão e os termos individuais lineares, quadráticos e de interação foram determinados pelo programa Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) com $p < 0,05$ e utilizados para gerar a plotagem da superfície de resposta e o gráfico de Pareto.

2.2.5 Efeito do pH na atividade enzimática

O efeito do pH na atividade da PG foi avaliado a 50°C para ambas as formas da enzima, utilizando soluções de pectina (10 mg/mL) em diferentes tampões, a 0,1 M, compreendendo o acetato de sódio (pH 3,5 -5,5), fosfato-fosfato (pH 5,5-7,0) e Tris-HCl (pH 7,0 - 9,0). Para fins de comparação a atividade enzimática, determinada como descrito na seção 2.2.3, foi expresso como atividade relativa percentual em relação ao seu valor máximo.

2.2.6 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática

A influência da temperatura na estabilidade da PG foi investigada utilizando alíquotas do extrato bruto enzimático ou da PG imobilizada previamente submetidas a diferentes temperaturas (30 a 65°C) por diferentes tempos (0; 2,5; 10; 15; 20 e 60 min) e analisando a atividade residual da PG utilizando uma solução de pectina (10 mg/mL) em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,5. O efeito da temperatura na atividade da PG foi avaliado para ambas as formas da enzima usando concentrações de pectina de 8 a 20 mg/mL em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,5, em temperaturas de 30°C a 65°C, mas sem qualquer incubação prévia. A atividade enzimática foi expressa como atividade relativa percentual em relação ao seu valor máximo.

2.2.7 Múltiplos reusos da poligalacturonase imobilizada

A PG imobilizada foi utilizada repetidamente em quatro ciclos sucessivos de atividade enzimática, e sua atividade residual foi determinada, conforme o descrito na seção 2.2.3. Depois de completar cada uso, as pérolas contendo a enzima imobilizada foram separadas, lavadas várias vezes e adicionadas a uma nova solução de substrato

(pectina cítrica em tampão acetato 0,1 M pH 4,5) para um novo ciclo de utilização (conforme o descrito na seção 2.2.3).

2.3. Teoria

2.3.1. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da reação enzimática

Os parâmetros cinéticos da reação catalisada pela PG livre e imobilizado foram determinados em diferentes temperaturas e concentração de substrato, fatores estes que mais influenciam a taxa de reação. Para isto, a atividade da PG foi avaliada variando a concentração inicial de pectina de 8 a 20 mg/mL e a temperatura de 30 a 60°C, e a constante de Michaelis (k_m) e velocidade máxima de reação (V_{max}) foram estimadas pelo método gráfico de Lineweaver Burk (THAKUR et al., 2010), enquanto a constante catalítica (k_{cat}) foi calculada como a razão de V_{max} e a concentração total da enzima (E_o).

Como em qualquer reação enzimática, a degradação da pectina a ácido galacturônico ocorre em uma taxa que depende das colisões entre as moléculas de pectinase e pectina. No entanto, de acordo com a teoria de Arrhenius (MICHEL, 2018), esta reação só poderá começar se as moléculas tiverem uma energia mínima suficiente para ativá-la, denominada energia de ativação (E^*). Por se tratar de uma catálise enzimática a PG reduz a E^* de degradação da pectina, acelerando a reação, mas E^* não exerce qualquer influência sobre a energia de Gibbs ou a constante de equilíbrio (K_{eq}) a uma dada temperatura. Para sistemas enzimáticos como este, a uma temperatura menor que a ideal, a equação de Arrhenius relaciona a taxa específica inicial de hidrólise (k_o), que é diretamente proporcional à atividade enzimática, à frequência de colisão (A_o) e à porção de colisões que tem a energia mínima para reagir ($e^{-\frac{E^*}{RT}}$):

$$k_o = A_o e^{-\frac{E^*}{RT}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde R é a constante de gás e T a temperatura absoluta.

Conceitos, tais como energia livre de gibbs de ativação (ΔG^*), entalpia (ΔH^*) e entropia (ΔS^*) são os pilares de compreensão de vários processos biológicos, tais como a reação enzimática, o envelhecimento de proteínas e interação com outras moléculas (QIAN; BEARD, 2005). Sendo assim, eles foram calculados pelas equações:

$$\Delta G^* = -RT \ln \left(\frac{k_{cat} h}{k_b T} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\Delta H^* = E^* - RT \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\Delta S^* = \frac{(\Delta H^* - \Delta G^*)}{T} \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde h é a constante de Planck e k_b a de Boltzmann.

No entanto, como explicado com mais detalhes na literatura (SILVA et al., 2018), qualquer enzima pode estar supostamente sujeita a um estado de equilíbrio de desdobramento proteico, que é o mais deslocado para a direita, quanto maior a temperatura (indicando perda da sua estrutura nativa). Assim, a uma temperatura maior que a ideal, a forma desnaturada da enzima torna-se predominante, e o processo é governado pela equação:

$$k_0 = \frac{A_0}{B} \exp \left(\frac{\Delta H_u^\circ - E^*}{RT} \right) \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde ΔH_u° é a variação de entalpia padrão de equilíbrio do desdobramento proteico e B um fator pré-exponencial adicional.

E^* e ΔH_u° foram então estimadas a partir linearização do efeito da temperatura sobre atividade enzimática, antes e depois da temperatura ótima de atuação da PG, respectivamente, as quais foram obtidas plotando em um gráfico semi-log da atividade enzimática inicial versus $1/T$.

2.3.2. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da termoinativação

Apesar da aceleração da reação enzimática, um aumento na temperatura promove não apenas o desdobramento da enzima, mas também a sua desnaturação. A temperatura constante, todas as enzimas de fato perdem progressivamente sua atividade em função do tempo, e quanto maior a temperatura, mais pronunciada é essa perda. Tem sido proposto que a taxa de decaimento da atividade enzimática é proporcional à atividade enzimática e, em seguida, pode ser tratada como uma reação irreversível de primeira ordem:

$$\frac{dA}{dt} = -k_d * A \quad (\text{Eq. 8})$$

Onde A é a atividade da enzima, t o tempo de exposição a uma dada temperatura e k_d a constante de desnaturação de primeira ordem.

O valor de k_d para cada temperatura, de 50 a 65°C para PG livre e de 30 a 65°C para a PG imobilizada, foi estimada como a inclinação da reta do gráfico semi-log da razão entre a atividade a um dado tempo e a atividade inicial ($\ln \psi = A/A_i$) versus o tempo de exposição. A energia de ativação da desnaturação (E_d^*) foi estimada pela equação de Arrhenius (Eq. 3), onde k_o foi substituído por k_d para cada temperatura.

O tempo de meia vida ($t_{1/2}$), o tempo de redução decimal (valor D) e o fator de sensibilidade (valor Z) são parâmetros importantes adicionais que permitem compreender mais profundamente a influência da temperatura no processo de desnaturação.

O $t_{1/2}$ é o tempo após o qual a atividade enzimática sofre uma redução para metade de sua atividade inicial:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (\text{Eq. 9})$$

O valor D é o tempo necessário para uma redução de 10 vezes da atividade inicial a uma dada temperatura, que está relacionada com k_d pela equação (LAVORENTI et al., 2003):

$$D = \frac{\ln 10}{k_d} \quad (\text{Eq. 10})$$

O valor Z é a temperatura necessária para reduzir o valor D em uma unidade de log, que foi calculada a partir da inclinação da linha reta obtida pela plotagem de $\log D$ vs. T (°C).

Os parâmetros termodinâmicos da desnaturação do PG (ΔG_d^* , ΔH_d^* e ΔS_d^*) foram estimados pelas seguintes equações:

$$\Delta H_d^* = E_d^* - RT \quad (\text{Eq. 11})$$

$$\Delta G_d^* = -RT \ln \left(\frac{k_d \cdot h}{k_b \cdot T} \right) \quad (\text{Eq. 12})$$

$$\Delta S_d^* = \frac{(\Delta G_d^* - \Delta H_d^*)}{T} \quad (\text{Eq. 13})$$

2.4. Resultados e discussão

2.4.1 Otimização da imobilização da poligalacturonase

Os resultados de otimização da PG de *A. aculeatus* URM4953 imobilizada em pérolas de alginato de cálcio estão mostrados na Tabela 2.1. Esses resultados foram bastante promissores, pois todos os ensaios realizados de acordo com o planejamento composto central proporcionaram um rendimento da imobilização (Y) superiores a 90%, exceto para aquele em que a PG foi imobilizada com glutaraldeído a 0,3 M por 8,8 min, que resultou em 87,9% de rendimento. O maior rendimento da atividade na imobilização ($Y = 95,1\%$) foi obtido utilizando glutaraldeído a 0,2 M com tempo de imobilização de 45 min (Tabela 2.1), condições em que a superfície de resposta apresentou uma região ótima (Fig. 2.1A).

Tabela 2.1. Planejamento composto central (PCC) utilizado para a otimização da imobilização por ligação covalente da poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 em pérolas de alginato de cálcio.

Concentração de glutaraldeído ^a	Tempo de imobilização ^a	Concentração de glutaraldeído (M) ^b	Tempo de imobilização (min) ^b	Rendimento da imobilização (%)
-1	-1	0,20	15	90,4
-1	1	0,20	45	95,1
1	-1	0,40	15	90,4
1	1	0,40	45	93,6
0	0	0,30	30	93,6
0	0	0,30	30	93,9
0	0	0,30	30	93,1
0	- α	0,30	8,8	87,9
0	+ α	0,30	51,2	92,6
- α	0	0,16	30	92,6
+ α	0	0,44	30	92,6

^a variáveis independentes codificadas.

^b valores reais das variáveis independentes.

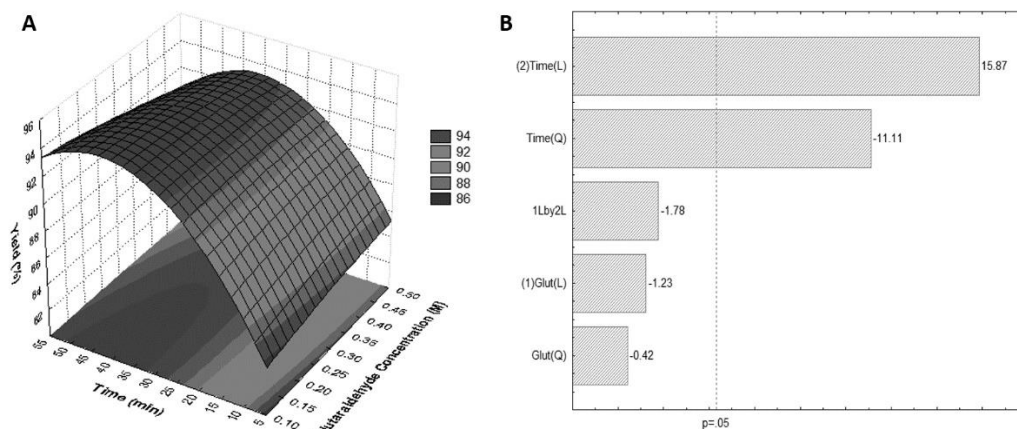


Fig. 2.1. Imobilização por ligação covalente de poligalacturonase do *Aspergillus aculeatus* URM4953 em pérolas de alginato de cálcio. (A) Superfície de resposta do rendimento de imobilização versus concentração de glutaraldeído e tempo. (B) Gráfico de Pareto mostrando os efeitos lineares e quadráticos sobre o rendimento.

A análise estatística revelou que o tempo foi a única variável independente que influenciou significativamente o rendimento da imobilização (Fig. 2.1b). Seu efeito linear positivo significa que um aumento no tempo de imobilização até 45 min levou a um aumento linear em Y , enquanto o valor quadrático negativo mostrou que além desse valor a resposta diminuiu. Apesar de seu alto rendimento, uma maneira alternativa de aumentar ainda mais este seria minimizar o tamanho das partículas, proporcionando maior área de superfície e, conseqüentemente, uma maior quantidade de enzima imobilizada. No entanto, em estudos anteriores (dados não mostrados), partículas menores não resistiam a forças de cisalhamento.

As condições ótimas de imobilização são descritas pela seguinte equação polinomial de segunda ordem:

$$Y (\%) = 79.4 + 9.64 x - 7.19 x^2 + 0.714 y - 0.00825 y^2 - 0.236 xy \quad (\text{Eq.14})$$

Onde x e y são os níveis codificados da concentração de glutaraldeído e tempo de imobilização da PG, respectivamente. Apesar da contribuição não estatisticamente significativa da concentração de glutaraldeído, mantivemos esta variável no modelo matemático como respeito hierárquico do planejamento. Apesar de R^2 encontrado foi de 0,91, a falta de ajuste não foi significativa ($p > 0,05$).

2.4.2 Efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade da poligalacturonase

A PG de *A. aculeatus* URM4953 livre e imobilizada apresentou quase o mesmo perfil de atividade versus pH, o que significa que, neste caso específico, a estratégia de imobilização não exerceu influência significativa sobre o mesmo. A PG, na forma livre ou imobilizada, mostrou, de fato, dois valores ótimos de pH, um sob condição ácidas (pH 4,0) e outro sob condição neutra (pH 7,0) (Fig. 2A).

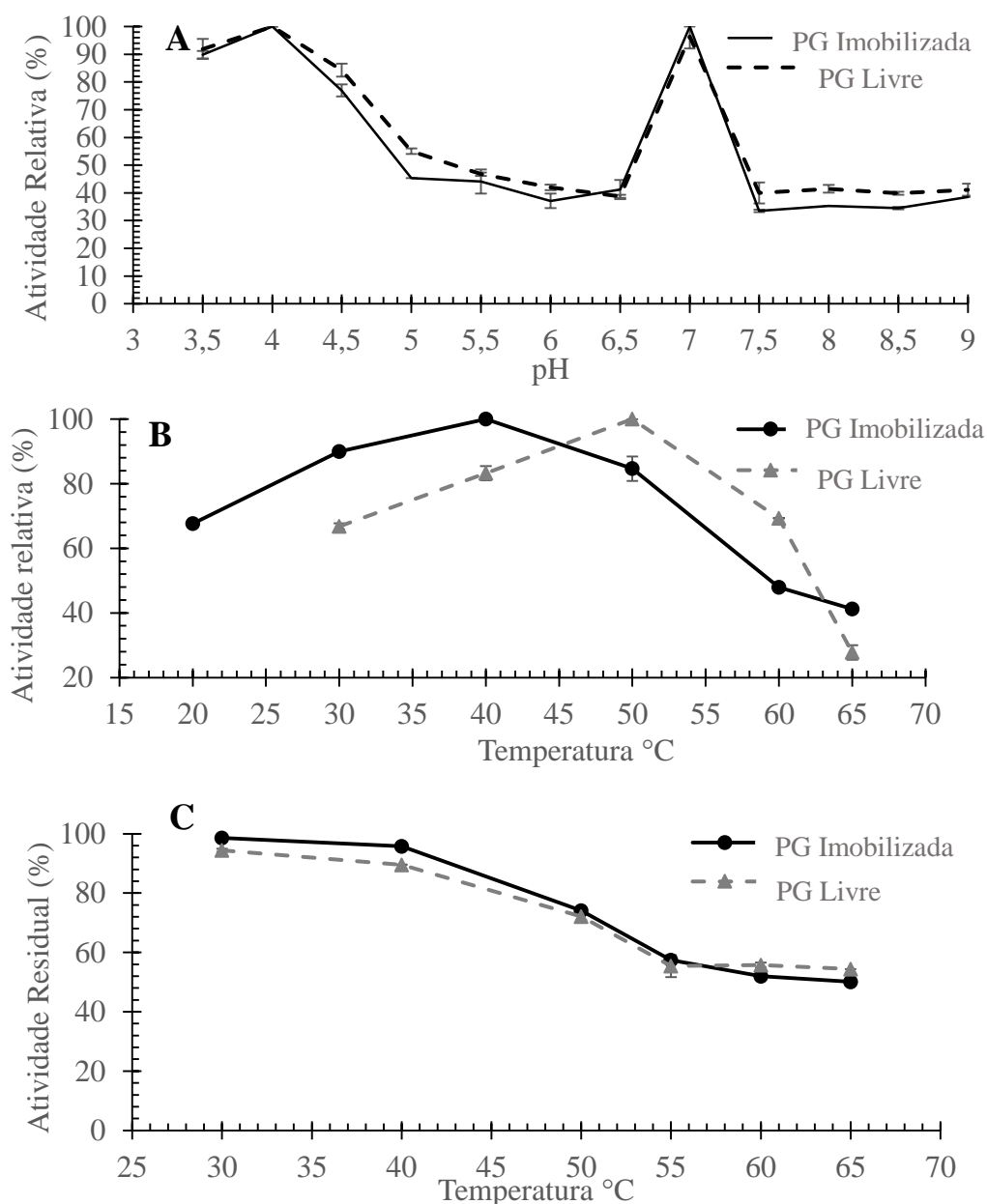


Fig. 2.2. Caracterização bioquímica da poligalacturonase do *Aspergillus aculeatus* URM4953 livre e imobilizada por ligação covalente em alginato de cálcio. (A) perfil da atividade enzimática em diferentes pH's, (B) perfil da atividade enzimática em diferentes temperaturas, (C) perfil estabilidade enzimática em diferentes temperaturas.

Segundo Pedrolli et al. (2009) e Jayani, Saxena e Gupta (2005), o pH ótimo das PG's pode variar de 3,0 a 5,8, para enzimas ácidas, e até 11 para enzimas alcalinas, dependendo de vários fatores, dentre os quais o tipo de micro-organismo. Os dois valores ótimos de pH observados na Fig. 2.2A podem ser atribuídos à presença de diferentes isoformas de poligalacturonase, como foi demonstrado para o *Aspergillus niger* que possui pelo menos sete isoformas de PG (PGI, PGII, PGA, PGB, PGC, PGD e PGE) (NINGA et al., 2018).

Por outro lado, o perfil de atividade versus temperatura foi bastante diferente para as formas livre e imobilizada da PG, enquanto a temperatura ótima do extrato bruto foi de 50°C, a imobilização reduziu para 40°C (Fig. 2.2B). Tal redução pode ser atribuída à presença de contaminantes protetores no extrato bruto, que não reagiu com o glutaraldeído durante o processo de imobilização. Além disso, os valores de K_m da PG imobilizada foram menores que os da livre o que significa que a imobilização aumentou a afinidade da PG pela pectina cítrica (ver Tabela 2.2 e discussão na seção 2.4.3).

Já a atividade residual após 60 min de 30 a 40°C exibiu quase o mesmo perfil para a PG livre e imobilizada, apresentando mais de 90% da atividade inicial em ambos os casos (Fig. 2.2C). A temperatura ótima da PG depende muito do micro-organismo e do tipo de fermentação, geralmente variando de 30 a 70°C (KASHYAP et al., 2001; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; KOHLI; GUPTA, 2015). Por exemplo, Fawole e Odunfa, (2003) e Maciel et al. (2014) relataram temperaturas ótimas da PG do *Aspergillus niger* e endo-PG *A. niger* URM4645 de 37 e 40°C, respectivamente. Enquanto que, valores superiores (50, 55 e 80°C) foram observados por Zhang et al. (2009) para três endo-PG de *Penicillium oxalicum*.

Como a estabilidade enzimática de longo prazo é de suma importância para aplicações industriais, foram testadas as esferas de alginato de cálcio contendo PG em quatro ciclos sucessivos de utilização. A PG imobilizada exibiu 95, 82 e 66% de sua atividade inicial após o segundo, terceiro e quarto ciclos, respectivamente (Fig. 2.3). Esta perda pode ser explicada pelo acúmulo de alguns compostos formados durante a reação e que não foram eliminados nas lavagens que antecedem cada ciclo apresentando uma forte interação com a superfície do suporte (LAGE et al., 2016). Contudo, esses resultados são ainda melhores que encontrados na literatura. Por exemplo, a PG imobilizada em alginato de cálcio do *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 preservou 80 e 65% de sua atividade inicial após 2 e 3 ciclos de utilização, respectivamente (REHMAN et al., 2013,

2016). Enquanto que, a PG do *Penicillium notatum* imobilizada de maneira similar manteve 78, 74, 72 e 60% de sua atividade inicial após 2, 3, 4 e 5 ciclos, respectivamente (AMIN et al., 2017). Já Oliveira et al., (2018a) imobilizaram uma pectinase comercial de *Aspergillus aculeatus* em pérolas de alginato de cálcio e foi verificado uma perda de mais de 35% de atividade após os quatro ciclos, enquanto que, Andriani et al., (2012) relataram uma perda de 90% para uma celulase de *Bacillus subtilis* TD6 similarmente imobilizada e reutilizada.

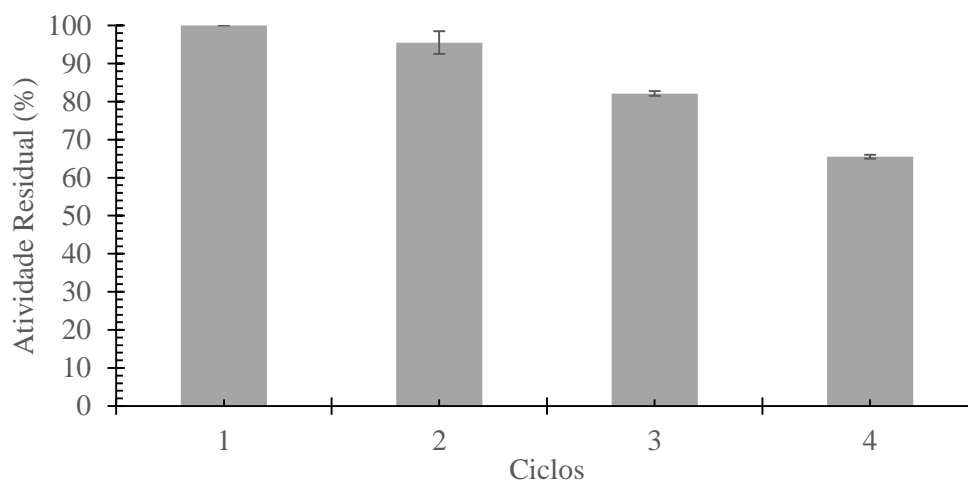


Fig. 2.3. Reutilização da poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio.

2.4.3 Cinética da degradação da pectina pela poligalacturonase

Os valores da constante de Michaelis (K_m), constante catalítica (k_{cat}) e velocidade máxima de reação (V_{max}) da degradação da pectina cítrica pela PG em diferentes temperaturas estão dispostos na Tabela 2.2

Tabela 2.2. Parâmetros cinéticos em diferentes temperaturas da poligalacturonase do *Aspergillus aculeatus* URM4953 livre e imobilizada por ligação covalente em alginato de cálcio.

Temperatura (°C)	PG livre			PG imobilizada		
	V_{max} (U/ml)	K_m (mg/mL)	K_{cat} (s ⁻¹)	V_{max} (U/ml)	K_m (mg/mL)	K_{cat} (s ⁻¹)
30	3,65	8,6	0,58	2,09	5,14	0,40
40	5,61	13,7	0,89	2,97	9,44	0,56
50	7,53	18,3	1,19	3,58	19,96	0,68
60	5,13	15,9	0,81	1,47	9,83	0,28

Pode-se observar que um aumento na temperatura de 30 a 50°C aumentou progressivamente K_m , indicando a redução da afinidade da PG pelo seu substrato (pectina) (RIAZ et al., 2012), tanto na forma livre como na imobilizada. Entretanto, a afinidade da enzima imobilizada ($5.14 \leq K_m \leq 19.96$ mg/mL) foi, em média, maior que a da livre ($8.6 \leq K_m \leq 18.9$ mg/mL). As PG's fúngicas geralmente apresentam valores de K_m entre 0,12 a 6,7 mg/mL (MOHAMED; CHRISTENSEN; MIKKELSEN, 2003), com os maiores valores ocorrendo na presença de contaminantes de atividade inibidora, o que possivelmente explicaria a menor afinidade pelo substrato da enzima presente no extrato bruto enzimático (CORNISH-BOWDEN, 2013). O V_{max} e k_{cat} também aumentaram com a temperatura, atingindo valores máximos a 50°C, com posterior queda (60°C), assim, em relação a estes parâmetros a enzima livre apresentou melhor comportamento que a enzima imobilizada.

O pior desempenho dos parâmetros cinéticos em alta temperatura (60°C), pode ter sido causado por inúmeros fatores, dentre estes, a possível existência de outras enzimas termorresistentes produzidas pelo *A. aculeatus* URM4953. Além disso, uma temperatura elevada pode ter acelerado o processo de desnaturação, afetando assim, a reação enzimática mesmo após o curto período de ensaio.

2.4.4 Termodinâmica de degradação da pectina pela poligalacturonase

A energia de ativação de degradação da pectina (E^*) e a variação da entalpia padrão do desdobramento da enzima (ΔH_u^o) foram estimadas em diferentes concentrações de pectina (8,0 a 20,0 mg/mL) (Tabela 2.3).

Tabela 2. 3. Energia de ativação (E^*) da degradação de pectina pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 e variação de entalpia padrão (ΔH_u^o) de equilíbrio do desdobramento da enzima estimado em diferentes concentrações de pectina, usando a enzima livre e a enzima imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio.

Concentração de pectina (mg/mL)	Enzima livre		Enzima imobilizada	
	E^* (kJ/mol)	ΔH_u^o (kJ/mol)	E^* (kJ/mol)	ΔH_u^o (kJ/mol)
8,0	9,91	57,10	13,5	27,42
10,0	11,2	60,70	17,7	29,72
12,0	12,4	62,51	18,7	33,01
14,0	16,6	86,85	21,6	38,48
16,0	14,6	90,76	25,4	38,95
18,0	16,2	100,67	26,2	39,73
20,0	17,2	102,78	33,8	42,52

Pode-se averiguar que estes parâmetros termodinâmicos aumentaram progressivamente com o aumento na concentração de pectina para ambas as formas da enzima, mas para a PG imobilizada os valores de E^* foram mais elevados que os da livre, indicando que esta última necessitou de menos energia para a formação do complexo ativado com pectina (complexo enzima-substrato), devido a maior mobilidade que esta forma possui, o que, aumenta a frequência de colisão (A_o) na Eq. 3. Além disso, a maior viscosidade do sistema que contém as pérolas de alginato, em comparação com a solução aquosa da enzima livre, certamente impediu o movimento das moléculas de pectina contribuindo, conseqüentemente, no aumento da energia de ativação (SCHOR, 1994). Porém, os valores ΔH_u° foram menores para a PG imobilizada, o que sugere uma possível estabilização da enzima na forma desenovelada, causada pelas mudanças proporcionadas no processo de imobilização. O que significa, que o estado de transição (complexo enzima-substrato) menos favorável da reação catalisada pela PG imobilizada pode ter sido parcialmente ou totalmente inibido por uma redução do desdobramento da molécula proteica. Tem sido sugerido que tal estabilização da enzima em altas temperaturas depende não somente de sua estabilidade intrínseca, mas também da estratégia adotada para a imobilização (PALOMO et al., 2002; MANOEL et al., 2015).

Como sabe-se, pequenos valores de E^* são desejados para aplicações industriais, pois há uma redução dos custos energéticos. De maneira análoga, baixos valores de ΔH_u° são indicativos do menor efeito de desdobramento proteico nos processos catalisados por enzimas. Para ambas as formas os valores de E^* são bastante promissores em comparação com a literatura. Por exemplo, os valores de da PG livre do *A. aculeatus* URM4953, nas concentrações mais baixas de pectina, foram muito próximos aos encontrados por Maisuria, Patel e Nerurkar (2010) para a PG livre da *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* BR1 (10,6 kJ/mol), mas sendo menor que a da preparação enzimática pectinolítica comercial Pectinase CCM (45,6 kJ/mol) (ORTEGA et al., 2004). A β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT7082 (HEIDTMANN et al., 2012), a endo-1,4- β -xilanase da *Thermotoga petrophila* (UL HAQ et al., 2012) e a invertase extraída da *Saccharum officinarum* L. (cana de açúcar) (HUSSAIN et al., 2009) apresentaram 40,96, 65,5 e 55,3 kJ/mol como valores de E^* , respectivamente, assim, a comparação com estas hidrolases, que também são de interesse industrial, confirma a condição termodinâmica favorável da reação aqui estudada.

Para estabelecer a termodinâmica geral de uma reação enzimática deve-se considerar a energia livre de Gibbs de ativação (ΔG^*) em vez da E^* (SILVA et al., 2018),

portanto, esse parâmetro foi estimado com o aumento da temperatura de 30 a 60°C (Tabela 2.4). Observa-se claramente, que este parâmetro aumenta com a temperatura indicando uma espontaneidade decrescente da degradação da pectina (RIAZ et al., 2007), mas, ao contrário do que se esperava, não dependeu da concentração de pectina sendo apenas uma função da temperatura. Os valores de ΔG^* obtidos com a enzima livre foram levemente inferiores aos da imobilizada, justificando a melhor cinética representada na Tabela 2.2.

Tabela 2.4. Energia livre de Gibbs de ativação (kJ/mol)^a da degradação da pectina pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953, na forma livre e imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio, em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	PG livre	PG imobilizada
30	75,6	76,6
40	77,1	78,3
50	78,8	80,3
60	82,0	85,4

^a A energia livre de Gibbs de ativação foi a mesma em todas as concentrações de pectina testadas (8,0-20,0 mg/mL).

No entanto, uma visão fundamental do comportamento da PG vem da análise dos valores de entalpia (ΔH^*) e entropia (ΔS^*) de ativação apresentados na Tabela 2.5 para ambas as formas da enzima em diferentes temperaturas e concentrações de pectina. Para a PG livre quanto para a imobilizada, tanto o aumento da temperatura quanto a diminuição da concentração de pectina levaram a uma redução do ΔH^* , o que significa que o complexo ativado estabelecido pela PG-pectina, foi mais estável nestas condições (RIAZ et al., 2007). Assim, como resultado a melhor situação entálpica viria da condição estabelecida a 60°C e 8,0 mg/mL de concentração de pectina. Além disso, como esperado, a redução de colisões efetivas das moléculas de PG e pectina induzida pela imobilização, os valores de ΔH^* obtidos com a PG livre foram sempre menores em comparação com a PG imobilizada.

Como sabe-se, para este tipo de sistema, ΔS^* está correlacionada com o grau de ordem (rigidez) do complexo enzima-substrato. Para este estudo, os menores valores desse parâmetro foram observados a 50°C para a PG livre e 40°C para a imobilizada, que correspondem às suas respectivas temperaturas ótimas previamente observadas (Fig. 2.2B). Menores valores de ΔS^* (em valor absoluto), para o sistema com a PG imobilizada, indicam que a estrutura do complexo enzima-substrato foi mais ordenada do que para a reação com a enzima livre (XIONG et al., 2005; RAJOKA, 2007). No entanto, a

contribuição entrópica mais favorável do sistema enzimático com a PG imobilizada foi insuficiente para superar a contribuição entálpica, culminando, assim em uma maior ΔG^* .

Tabela 2.5. Entalpia (ΔH^*) e entropia (ΔS^*) de ativação da degradação da pectina pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953, na forma livre imobilizada e covalentemente em pérolas de alginato de cálcio, a diferentes temperaturas e concentrações de pectina.

Concentração de pectina (mg/mL)	Temperatura (°C)	Enzima livre		Enzima imobilizada	
		ΔH^* (kJ/mol)	ΔS^* (J/mol·K)	ΔH^* (kJ/mol)	ΔS^* (J/mol·K)
8,0	30	7,39	-225,2	11,0	-216,4
	40	7,31	-223,0	10,9	-215,2
	50	7,22	-221,8	10,8	-215,2
	60	7,14	-224,8	10,8	-224,1
10,0	30	8,71	-220,8	15,2	-202,6
	40	8,63	-218,7	15,1	-201,8
	50	8,55	-217,7	15,0	-202,3
	60	8,47	-220,8	14,9	-211,6
12,0	30	9,91	-216,9	16,2	-199,2
	40	9,82	-214,9	16,1	-198,5
	50	9,74	-214,0	16,1	-199,0
	60	9,66	-217,3	16,0	-208,4
14,0	30	14,1	-203,1	19,1	-189,8
	40	14,0	-201,5	19,0	-189,5
	50	13,9	-201,0	18,9	-190,3
	60	13,8	-204,7	18,8	-199,9
16,0	30	12,10	-209,7	22,9	-177,0
	40	12,01	-207,9	22,9	-177,1
	50	11,93	-207,2	22,8	-178,3
	60	11,85	-210,7	22,7	-188,3
18,0	30	13,73	-204,3	23,7	-174,5
	40	13,65	-202,7	23,6	-174,6
	50	13,56	-202,1	23,5	-175,9
	60	13,48	-205,8	23,5	-186,0
20,0	30	14,72	-201,0	31,3	-149,5
	40	14,64	-199,5	31,2	-150,4
	50	14,55	-199,1	31,1	-152,5
	60	14,47	-202,8	31,0	-163,2

Como conclusão para esta seção, a combinação dos parâmetros termodinâmicos da degradação da pectina pela PG do *A. aculeatus* URM4953 levou a uma condição de eficiência um pouco mais favorável (ΔH^*), grau de ordem (ΔS^*) e espontaneidade (ΔG^*)

a 30°C e 8,0 mg/mL de pectina, sendo mais efetivo para a enzima livre do que a imobilizada.

2.4.5 Cinética da inativação térmica da poligalacturonase

Nos processos industriais, as enzimas estão sujeitas a desnaturação sob variação de temperatura e exposição prolongada a estas. Alguns parâmetros podem ser estimados para controlar a inativação das enzimas e evitar, ou pelo menos reduzir, sua desnaturação prematura, enquanto os parâmetros de ativação descritos anteriormente são úteis para descrever as reações catalisadas por eles.

Devido a inativação térmica, a atividade enzimática se torna uma função do tempo e da temperatura, além de outros fatores, como a estratégia de imobilização. Após o aquecimento, algumas enzimas começam a perder sua atividade, o que progride gradualmente ao longo do tempo. Uma vez que, um aumento de temperatura leva a um aumento na vibração das moléculas, assim, as ligações de hidrogênio são mais facilmente quebradas, e a perda da atividade da enzima se torna mais pronunciada.

A estimativa da constante de inativação de primeira ordem (k_d) da PG livre não foi bem-sucedida em temperaturas abaixo de 50°C, provavelmente devido à presença de alguns contaminantes no extrato bruto que o afetou fortemente o processo desnaturante. Então, tal parâmetro cinético foi estimado de 50 a 65°C para a PG livre, e de 30 a 65°C para PG imobilizada (Tabela 2.6).

Tabela 2.6. Parâmetros cinéticos da inativação térmica da poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953, na forma livre e imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio, a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Enzima livre					Enzima imobilizada				
	k_d (min ⁻¹)	R ²	$t_{1/2}$ (min)	D (min)	Z (°C)	k_d (min ⁻¹)	R ²	$t_{1/2}$ (min)	D (min)	Z (°C)
30	**	**	**	**		0,004	0,94	177,7	590,5	
40	**	**	**	**		0,009	0,97	72,9	242,4	
50	0,007	0,94	100	333	4,6	0,030	0,99	22,9	76,2	9,5
55	0,013	0,93	52,1	173		0,049	0,97	13,9	46,4	
60	0,058	0,99	11,9	39,4		0,085	0,99	8,1	27,1	
65	0,161	0,97	4,29	14,3		0,146	0,97	4,7	15,7	

** Não foi possível determinar k_d .

A PG imobilizada apresentou maiores valores de k_d que a PG livre, o que significa que a temperatura afetou mais a atividade na primeira que esta última. Além disso, a meia vida ($t_{1/2}$) e o tempo de redução decimal (valor D) da PG livre foram maiores, provavelmente porque, com a imobilização a enzima ficou mais exposta na superfície da pérola. Isto, corrobora como o aumento do fator de sensibilidade (valor Z) resultante da imobilização (Tabela 2.6). Maisuria, Patel e Nerurkar (2010) encontraram um $t_{1/2}$ de 99 min a 50°C para a PG livre de *E. carotovora* subsp. *carotovora*, praticamente coincidente como o do presente estudo (100 min), enquanto que, Ortega, Diego e Perez-Mateos (2004) relataram um $t_{1/2}$ de apenas 28,88 min para a Pectinex 3XL na mesma temperatura.

2.4.7 Termodinâmica de inativação térmica da poligalacturonase

A energia de ativação da termoinativação irreversível (E^*_d) foi de 188,9 e 89,7 kJ/mol para a PG livre e imobilizada, respectivamente, o que significa que a enzima livre necessitou de mais energia para ser desnaturada. Uma grande variabilidade nos valores de E^*_d pode ser encontrada na literatura para enzimas pectolíticas. Por exemplo, Basu et al. (2008) encontraram um menor valor de E^*_d (50,52 kJ/mol) para a pectato liase de *Bacillus pumilus* DKS1, enquanto, Dogan, Tari e gogus (2007) relataram um valor de 151,81 kJ/mol para a PG do *Aspergillus sojae*. Ainda, vale salientar que altos valores de E^*_d são muito desejados em aplicações de enzimas industriais, pois evidenciam uma elevada termoestabilidade, embora, em algumas preparações alimentícias como a pasta de tomate, a desnaturação de PG seja preferível porque pode fornecer mudanças organolépticas indesejadas ao produto final (FACHIN et al., 2003).

Tabela 2.7. Energia livre de Gibbs de ativação (ΔG^*_d , kJ/mol), entalpia de ativação (ΔH^*_d , kJ/mol) e entropia de ativação (ΔS^*_d , J/mol.K) da termoinativação da poligalacturonase do *Aspergillus aculeatus* URM4953, na forma livre e imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio, a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	PG livre			PG imobilizada		
	ΔG^*_d	ΔH^*_d	ΔS^*_d	ΔG^*_d	ΔH^*_d	ΔS^*_d
30	**	**	**	98,59	86,55	-39,71
40	**	**	**	99,60	86,46	-41,96
50	103,69	186,17	255,25	99,76	86,38	-41,40
55	103,55	186,13	251,65	99,99	86,34	-41,61
60	101,10	186,09	255,10	100,07	86,30	-41,34
65	99,81	186,05	255,04	100,08	86,26	-40,88

** Não foi possível determinar energia livre de Gibbs de ativação, a entalpia de ativação e a entropia de ativação da termoinativação.

O conhecimento geral da desnaturação térmica enzimática requer uma visão geral de todos os parâmetros termodinâmicos além da E^*_d (HEIDTMANN et al., 2012), exatamente como enfatizado na seção 2.4.4 para a reação catalisada pela PG. A entalpia de ativação de termoinativação irreversível (ΔH^*_d), está relacionada ao número de ligações não covalentes quebradas durante a desnaturação (ORTEGA; DE DIEGO; PEREZ-MATEOS, 2004), para este estudo foi encontrado para este parâmetro valores entre 186,05-186,17 e 86,26-86,55 kJ/mol (Tabela 2.7), para a PG livre e imobilizada, respectivamente. Assumindo que a energia média de uma ligação não covalente, que compreende a ligação de hidrogênio, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals (todas estas contribuem para manter a forma nativa e funcional da enzima) (ANFENSEN, 1973), é de aproximadamente 5,4 kJ/mol (PACE, 1992), assim, aproximadamente 35 e 16 ligações não covalentes foram quebradas e causaram a desnaturação da PG livre e imobilizada, respectivamente.

A entropia de ativação da termoinativação (ΔS^*_d) encontrada manteve-se entre 251,65 a 255,25 e -41,96 a -39,71 J/mol.K (Tabela 2.7) para a PG livre e imobilizada, respectivamente. Seus respectivos sinais positivos e negativos significam que a desnaturação foi espontânea no primeiro caso, mas não espontânea no segundo. Em outras palavras, além do efeito de estabilização do desdobramento da enzima, já descrito, a imobilização pode ter reduzido o grau de ordem do estado de transição da etapa subsequente de desnaturação (MELIKOGLU; LIN; WEBB, 2013), aumentando assim, a termoestabilidade da enzima. Este fenômeno explica o motivo da PG imobilizada exibir alta atividade durante o segundo e terceiro ciclo sucessivo de uso (Fig. 2.3), mesmo em testes de 40 min a 50°C (ver seção 2.2.3). Os valores de ΔS^*_d muito mais baixos observados para a termoinativação enzimática da PG imobilizada, comparados com os da livre, confirmam a drástica redução do grau de desordem na ruptura da estrutura da enzima (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011) esperado pelo processo de imobilização. Alguns autores atribuem os valores negativos de ΔS^*_d ao fenômeno de compactação da molécula enzimática, que seria produto de inúmeros fatores, como, a formação de partículas carregadas ao redor da enzima, do efeito de ordenação das moléculas do solvente (GUMMADI; PANDA, 2003), ou mesmo devido a influência do pH (NAIDU; PANDA, 2003; MAISURIA; PATEL; NERURKAR, 2010), mas este último não se aplicam neste caso. Fernandez-Lopez et al., (2017) sugeriram que o aglomeramento proteico devido ao processo de imobilização pode reduzir a mobilidade, aumentando, possivelmente, a estabilidade da enzima.

A Tabela 2.7 também apresenta os valores da energia livre de Gibbs de ativação da termoinativação (ΔG^*_d) em temperaturas de 50 a 65°C para a PG livre e de 30 a 65°C para a PG imobilizada. Este parâmetro, que é diferente para os estados nativo e desnaturado da enzima, indica o quanto a conformação nativa (e funcional) ainda está preservada (HEIDTMANN et al., 2012). Pode-se atestar que ΔG^*_d para a PG imobilizada foi sempre menor que para a PG livre, o que significa que, apesar de uma contribuição entrópica mais favorável, as moléculas de enzima ligadas à superfície externa das pérolas de alginato foram menos protegidas que as enzimas na forma livre contra as condições adversas do ambiente circundante, mostrando assim uma contribuição entálpica mais desfavorável (menos de metade do valor corresponde a ΔH^*_d). No entanto, ΔG^*_d da PG livre diminuiu com o aquecimento, o que significa que a desnaturação da PG foi um processo espontâneo tendendo a um valor mínimo no equilíbrio (ALBERTY, 2006), enquanto o ΔG^*_d da PG imobilizada aumentou com o aquecimento, mostrando melhor termoestabilidade durante as repetidas utilizações (Fig. 2.3).

Com base nestas observações, a inativação térmica da PG ao longo do tempo pode ser descrita pelo esquema geral como $N \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} U \xrightarrow{k_3} D$ (CARVALHO et al., 2003), onde N é o estado nativo, U é o estado desdobrado reversível, e D é o estado desnaturado irreversível final. Quando a PG está presente na forma livre, este modelo pode ser convertido em um modelo de passo único ($N \rightarrow D$) assumindo que k_1 , k_2 e k_3 são todas constantes cinéticas de primeira ordem e $k_3 \gg k_2$. Neste caso, nenhum equilíbrio entre N e U é estabelecido durante a desnaturação. Portanto, todas as moléculas U formadas são preferencialmente convertidas em D em vez de redobradas para formar N. A concentração de moléculas U é insignificante neste caso, e a desnaturação depende apenas de k_1 . No entanto, depois de imobilizado, a PG tem o k_2 aumentado, deslocando o equilíbrio para a esquerda. Então, após o resfriamento, o enovelamento ocorre espontaneamente.

Os parâmetros termodinâmicos estimados neste estudo para a termoinativação da PG imobilizada estão relativamente próximos aos descritos Ortega et al. (2004) para uma pectinase comercial (Pectinex 3XL) em sua forma livre ($\Delta H^*_d=157$ kJ/mol, $103 \leq \Delta G^*_d \leq 99,8$ kJ/mol e $\Delta S^*_d=176$ J/mol.K). Por outro lado, Oliveira et al., (2018b) observaram um comportamento diferente para os parâmetros termodinâmicos de uma pectinase comercial de *A. aculeatus*. Enquanto, que no presente trabalho ΔG^*_d da pectinase livre diminuiu com o aumento da temperatura devido à desnaturação, a da pectinase livre de *A. aculeatus* aumentou de 101,8 para 104,7 kJ mol denotando termoestabilidade especial,

mas aquela da enzima aprisionada nas pérolas de alginato manteve-se quase constante ($100,77 \leq \Delta G^*_d \leq 100,60$ kJ/mol).

Outras enzimas industriais relatadas na literatura se comportaram de forma semelhante a enzima livre, aqui estudada. Um aumento na temperatura levou a um decréscimo do ΔG^*_d de uma lipase de *Penicillium notatum* de 104,54 a 97,82 kJ/mol (REHMAN et al., 2017) e de uma ciclodextrina glicosiltransferase de *Bacillus amyloliquefaciens* de 71,72 a 70,10 kJ/mol (ABDEL-NABY; FOUAD; REYED, 2015).

2.5. Conclusão

Uma nova poligalacturonase de *A. aculeatus* URM4953 (PG) foi covalentemente imobilizada em pérolas de alginato de cálcio, com um rendimento de 95% sob condições otimizadas. A enzima imobilizada exibiu os mesmos valores ótimos de pH que a livre tanto em condição ácida (pH 4,0) quanto neutra (pH 7,0), mas sua temperatura ótima (40°C) foi 10°C mais baixa. Ambas as PG's foram estáveis até 40°C, preservando mais de 90% de sua atividade inicial. Os parâmetros cinéticos mostraram que, embora o PG imobilizada tivesse mais afinidade pela pectina que a PG livre, foi um pouco menos eficaz na sua degradação. Os parâmetros termodinâmicos da inativação térmica da enzima sugeriram que sua desnaturação foi principalmente reversível, permitindo até quatro ciclos de reutilização. As PG's, livre e imobilizada, apresentaram um desempenho satisfatório com grande potencial para futura exploração industrial.

2.6. Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da FACEPE (Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Recife, Brasil), da CAPES (Conselho Nacional de Aperfeiçoamento da Educação Superior, Brasília, Brasil) e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERÊNCIAS

ABDEL-NABY, M.; FOUAD, A.; REYED, R. Catalytic and thermodynamic properties of immobilized *Bacillus amyloliquefaciens* cyclodextrin glucosyltransferase on different carriers. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 116, p. 140–147, 2015.

ALBERTY, R. A. Relations between biochemical thermodynamics and biochemical kinetics. **Biophysical Chemistry**, v. 124, p. 11–17, 2006.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; BILAL, M.; ASGHER, M. Multiple Parameter Optimizations for Enhanced Biosynthesis of Exo-polygalacturonase Enzyme and its Application in Fruit Juice Clarification. **International Journal of Food Engineering**, v. 13, 2017.

ANDRIANI, D.; SUNWOO, C.; RYU, H. W.; PRASETYA, B.; PARK, D. H. Immobilization of cellulase from newly isolated strain *Bacillus subtilis* TD6 using calcium alginate as a support material. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 29–33, 2012.

ANFINSEN, C. B. A. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. **Science**, v. 181, p. 223–230, 1973.

BASU, S.; GHOSH, A.; BERA, A.; SAHA, M. N.; CHATTOPADHYAY, D.; CHAKRABARTI, K. Thermodynamic characterization of a highly thermoactive extracellular pectate lyase from a new isolate *Bacillus pumilus* DKS1. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8088–8094, 2008.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N.; HU, H.; WANG, W.; ZHANG, X. Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes. **Journal of Environmental Management**, v. 188, p. 137–143, 2017.

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

CARVALHO, A. S. L.; MELO, E. P. E.; FERREIRA, B. S.; NEVES-PETERSEN, M. T.; PETERSEN, S. B.; AIRES-BARROS, M. R. Heme and pH-dependent stability of an anionic horseradish peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 415, p. 257–267, 2003.

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; ALBERNAZ, J. R. M.; SOARES, M. H.; SATO, H. H. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 199–207, 2015.

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

CHEN, F.; JIA, J.; ZHANG, Q.; YANG, L.; GU, H. Isolation of essential oil from the leaves of *Polygonum viscosum* Buch-ham. using microwave-assisted enzyme pretreatment followed by microwave hydrodistillation concatenated with liquid – liquid extraction. **Industrial Crops & Products journal**, v. 112, p. 327–341, 2018.

CORNISH-BOWDEN, A. The origins of enzyme kinetics. **FEBS Letters**, v. 587, p. 2725–2730, 2013.

DOGAN, N.; TARI, C.; GOGUS, N. Kinetic and thermodynamic properties of crude and three-phase partitioned polygalacturonase from *Aspergillus sojae*. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 224–235, 2007.

EL-LOLY, M.; AWAD, A.; MANSOUR, A. Thermal Kinetics Denaturation of Buffalo Milk Immunoglobulins. **International Journal of Dairy Science**, v. 2, p. 292–302, 2007.

FACHIN, D.; VAN LOEY, A. M.; LY NGUYEN, B.; VERLENT, I.; INDRAWATI, A.; HENDRICKX, M. E. Inactivation kinetics of polygalacturonase in tomato juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 4, p. 135–142, 2003.

FAWOLE, O.; ODUNFA, S. A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 223–227, 2003.

FERNANDEZ-LOPEZ, L.; PEDRERO, S. G.; LOPEZ-CARROBLES, N.; GORINES, B. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 18–25, 2017.

FONTANA, R. C.; POLIDORO, T. A.; SILVEIRA, M. M. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4493–4498, 2009.

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

HABRYLO, O.; EVANGELISTA, D. E.; CASTILHO, P. V.; PELLOUX, J.; HENRIQUE-SILVA, F. The pectinases from *Sphenophorus levis*: Potential for biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 499–508, 2018.

HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P. De; BRAGA, A. R. C.; KALIL, S. J. Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 41–49, 2012.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; BERGMANN, C. W.; LOERA-CORRAL, O.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; HUERTA-OCHOA, S.; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; PRADO-BARRAGÁN, L. A. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2001–2006, 2011.

HUSSAIN, A.; RASHID, M. H.; PERVEEN, R.; ASHRAF, M. Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 188–194, 2009.

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

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

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

KOZIOŁ, A.; CYBULSKA, J.; PIECZYWEK, P. M.; ZDUNEK, A. Changes of pectin nanostructure and cell wall stiffness induced in vitro by pectinase. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 197–207, 2017.

LAGE, F. A. P.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. C.; TODERO, L. M.; LUIZ, J. H. H.; MENDES, A. A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56–67, 2016.

LAVORENTI, A.; ROCHA, A. A.; PRATA, F.; REGITANO, J. B.; TONISIELO, V. L.; PINTO, O. B. Comportamento do diclosulam em amostras de um latossolo vermelho distroférico sob plantio direto e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 183–190, 2003.

MA, X.; WANG, D.; YIN, M.; LUCENTE, J.; WANG, W.; DING, T.; YE, X.; LIU, D. Characteristics of pectinase treated with ultrasound both during and after the immobilization process. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 1–10, 2017.

MACIEL, M. H. C.; HERCULANO, P. N.; FERNANDES, M. J. S.; PORTO, T. S.; LIMA, J. S.; MAGALHES, O. C.; SILVA, L. R. C.; PORTO, A. L. F.; MOREIRA, K. A.; MOTTA, C. M. S. Pectinolytic complex production by *Aspergillus niger* URM 4645 using yellow passion fruit peels in solid state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 3313–3322, 2014.

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

MAISURIA, V. B.; PATEL, V. A.; NERURKAR, A. S. Biochemical and thermal stabilization parameters of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* BR1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 1077–1085, 2010.

MANOEL, E. A.; DOS SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53–57, 2015.

MELIKOGLU, M.; LIN, C. S. K.; WEBB, C. Kinetic studies on the multi-enzyme solution produced via solid state fermentation of waste bread by *Aspergillus awamori*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, p. 76–82, 2013.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. D. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831–840, 2011.

MICHEL, D. A probabilistic rate theory connecting kinetics to thermodynamics. **Physica A**, v. 503, p. 26–44, 2018.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1 mar. 1959.

MOHAMED, S. A.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; MIKKELSEN, J. D. New polygalacturonases from *Trichoderma reesei*: characterization and their specificities to partially methylated and acetylated pectins. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 515–524, 2003.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 57–67, 2003.

NINGA, K. A.; SENGUPTA, S.; JAIN, A.; DESOBGO, Z. S. C.; NSO, E. J.; DE, S. Kinetics of enzymatic hydrolysis of pectinaceous matter in guava juice. **Journal of Food Engineering**, v. 221, p. 158–166, 2018.

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

OLIVEIRA, R. L.; SILVA, O. S.; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Thermodynamic and kinetic studies on pectinase extracted from *Aspergillus aculeatus*: Free and immobilized enzyme entrapped in alginate beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 1088–1093, 2018b.

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

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

PACE, C. N. Contribution of the hydrophobic effect to globular protein stability. **Journal of Molecular Biology**, v. 226, p. 29–35, 1992.

PALOMO, J. M.; MUOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19, p. 279–286, 2002.

PEDROLI, D. B.; MONTEIRO, A. C.; GOMES, E.; CANO CARMONA, E. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. **The Open Biotechnology Journal**, v. 3, p. 9–18, 2009.

PETKOVA, G. A.; ZÁRUBA, K.; KRÁL, V. Synthesis of silica particles and their application as supports for alcohol dehydrogenases and cofactor immobilizations: Conformational changes that lead to switch in enzyme stereoselectivity. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1824, p. 792–801, 2012.

QIAN, H.; BEARD, D. A. Thermodynamics of stoichiometric biochemical networks in living systems far from equilibrium. **Biophysical Chemistry**, v. 114, p. 213–220, 2005.

RAI, K. M.; BALASUBRAMANIAN, V. K.; WELKER, C. M.; PANG, M.; HII, M. M.; MENDU, V. Genome wide comprehensive analysis and web resource development on cell wall degrading enzymes from phyto-parasitic nematodes. **BMC Plant Biology**, v. 15, p. 1–15, 2015.

RAJOKA, M. I. Kinetic parameters and thermodynamic values of β -xylosidase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2212–2219, 2007.

REHMAN, H. U.; AMAN, A.; NAWAZ, M. A.; KARIM, A.; GHANI, M.; BALOCH, A. H.; QADER, S. A. U. Immobilization of pectin depolymerising polygalacturonase using different polymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 127–133, 2016.

REHMAN, H. U.; AMAN, A.; SILIPO, A.; QADER, S. A. U.; MOLINARO, A.; ANSARI, A. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. **Food Chemistry**, v. 139, p. 1081–1086, 2013.

REHMAN, S.; BHATTI, H. N.; BILAL, M.; ASGHER, M.; WANG, P. Catalytic, Kinetic and Thermodynamic Characteristics of an Extracellular Lipase from *Penicillium notatum*. **Catalysis Letters**, v. 147, p. 281–291, 2017.

RIAZ, M.; PERVEEN, R.; JAVED, M. R.; NADEEM, H.; RASHID, M. H. Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 558–564, 2007.

RIAZ, M.; RASHID, M. H.; SAWYER, L.; AKHTAR, S.; JAVED, M. R.; NADEEM, H.; WEAR, M. Physiochemical properties and kinetics of glucoamylase produced from deoxy-D-glucose resistant mutant of *Aspergillus niger* for soluble starch hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 130, p. 24–30, 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, p. 2217–2222, 2011.

SANTOS, J. C. S. D.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 2015.

SCHOR, H. H. R. Dinâmica de Reações químicas: de Boltzmann á femtoquímica. **Química Nova**, v. 17, p. 483–488, 1994.

SIEIRO, C.; GARCÍA-FRAGA, B.; LÓPEZ-SEIJAS, J.; SILVA, A. F. Da; VILLA, T. G.; GARCÍA-FRAGA, B.; LÓPEZ-SEIJAS, J. Microbial pectic enzymes in the food and wine industry. In: Valdez, B. Food Industrial Processes – Methods and Equipment. Rijeka: **InTech**. 2012. p. 201–218.

SILVA, O. S.; LIRA DE OLIVEIRA, R. L. oliveira; SILVA, J. carvalho; CONVERTI, A.; PORTO, T. S. Thermodynamic investigation of an alkaline protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: A comparative approach between crude extract and purified enzyme. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1039–1044, 2018.

SMITH, L. J.; FIEBIG, K. M.; SCHWALBE, H.; DOBSON, C. M. The concept of a random coil Residual structure in peptides and denatured proteins. **Folding & Design**, v. 1, p. 95–106, 1996.

SOUZA, R. L. a.; OLIVEIRA, L. D. S. C.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 987–992, 2010.

THAKUR, A.; PAHWA, R.; SINGH, S.; GUPTA, R. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. **Enzyme Research**, v. 7, p. 1–7, 2010.

UENOJO, M.; PASTORE, M. pastore. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388–394, 2007.

UL HAQ, I.; HUSSAIN, Z.; KHAN, M. A.; MUNEER, B.; AFZAL, S.; MAJEED, S.; AKRAM, F. Kinetic and thermodynamic study of cloned thermostable endo-1,4- β -xylanase from *Thermotoga petrophila* in mesophilic host. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 7251–7261, 2012.

XIONG, Y.-H.; LIU, J.-Z.; SONG, H.-Y.; JI, L.-N.; LIU, J.-Z. Purification, kinetic and thermodynamic studies of a new ribonuclease from a mutant of *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 348–356, 2005.

ZHANG, C.-H.; LI, Z.-M.; PENG, X.-W.; JIA, Y.; ZHANG, H.-X.; BAI, Z.-H. Separation, purification and characterization of three endo-polygalacturonases from a newly isolated *Penicillium oxalicum*. **Journal of Process Engineering**, v. 9, p. 242–249, 1 abr. 2009.

ZHOU, Z. D.; LI, G. Y.; LI, Y. J. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 21–26, 2010.

CAPÍTULO II

HIDRÓLISE DE PECTINA EM SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale*) PELA POLIGALACTURONASE DE *Aspergillus aculeatus* URM4953 IMOBILIZADA COVALENTEMENTE EM PÉROLAS DE ALGINATO DE CÁLCIO: ESTUDO CINÉTICO E TERMODINÂMICO.



Artigo a ser submetido ao Journal International Journal of Biological Macromolecules

INS: 0141-8130

Fator de Impacto: 3,909

Qualis: A1 (Ciência de alimentos)

Hidrólise de pectina de suco de caju (*Anacardium occidentale*) pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio: estudo cinético e termodinâmico.

Pectin hydrolysis in cashew apple juice (*Anacardium occidentale*) by *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonase covalently-immobilized on calcium alginate beads: A kinetic and thermodynamic study.

Jônatas de Carvalho Silva^{a#}, Pedro Renann Lopes de França^{b#}, Attilio Converti^c, Tatiana Souza Porto^{a,b*}

^aRede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil, 52171-900

^bUniversidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade acadêmica de Granhuns, Avenida Bom Pastor, s/n - Boa Vista, Garanhuns, Pernambuco, Brazil, 55292-270

^cDepartamento de Engenharia Civil, Química e Ambiental, Pólo de Engenharia Química, Universidade de Gênova, via Opera Pia 15, Gênova, Itália, 16145

[#]Contribuiu igualmente para o artigo

RESUMO

A cinética e termodinâmica da degradação da pectina presente no suco de caju pela poligalacturonase (PG), oriunda do *Aspergillus aculeatus* URM4953, imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio foram investigadas para melhor compreensão deste fenômeno. No suco de caju a atividade da PG imobilizada foi mais pronunciada na temperatura de 20°C, apresentando um V_{max} de 58,71 mg/ml/min, uma K_{cat} de 166,2 s⁻¹ e um $K_{0,5}$ de 112,9 mg/mL. A enzima neste substrato apresentou comportamento alostérico, logo o modelo cinético utilizado para estudo da cinética enzimática de hidrólise da pectina foi descrito pela Equação de Hill. O número de Hill aumentou de 3 para 5 (20 a 50°C), evidenciando um mecanismo de cooperação positiva. A cinética de degradação em função do tempo mostrou alto ajuste, permitindo a predição do processo de hidrólise da pectina em suco de caju. A energia de ativação (E^*) e a entalpia padrão de equilíbrio de desdobramento (ΔH°_u) da reação foram de 80,31 e 16,57 kJ/mol, respectivamente. Corroborando com os resultados cinéticos, a hidrólise da pectina do suco catalisada pela PG apresentou maior espontaneidade a 20°C, exibindo assim um ΔG^* , ΔH^* e ΔS^* de 59,3 kJ/mol, 77,9 kJ/mol e 63,4 J/K.mol, respectivamente. Assim, a PG imobilizada apresentou desempenho satisfatório na hidrólise da pectina de suco de caju, necessitando de baixa temperatura para atuar de maneira ótima.

Palavras-chave: Suco de caju; hidrólise da pectina; Poligalacturonase; *Aspergillus aculeatus* URM4953; Termodinâmica; Cinética.

ABSTRACT

The kinetics and thermodynamics of pectin hydrolysis in cashew apple juice by polygalacturonase (PG) from *Aspergillus aculeatus* URM4953 covalently-immobilized on calcium alginate beads were investigated. Immobilized-PG activity in cashew apple juice was the highest at 20°C, showing a V_{\max} of 58.17 mg/ml/min, k_{cat} of 166.2 s⁻¹ and $K_{0.5}$ of 112.9 mg/mL. Since the enzyme exhibited allosteric behavior, hydrolysis kinetic in function of pectin concentration was modeled by the Hill Equation. Hill coefficient increased from 3 to 5 (20 to 50°C), evidencing a positively cooperativity mechanism. Degradation kinetic in function of time displayed high adjustment being predictable for pectin hydrolysis in cashew apple juice. Activation energy (E^*) and unfolding standard enthalpy ($\Delta H^{\circ}_{\text{u}}$) of the reaction were 80.31 and 16.57 kJ/mol, respectively. Consistently with kinetic results, PG-catalyzed pectin hydrolysis had maximum spontaneity at 20°C, exhibiting ΔG^* , ΔH^* and entropy ΔS^* of 59.3 kJ/mol, 77.9 kJ/mol and 63.4 J/K.mol, respectively. Immobilized PG showed satisfactory performance in the hydrolysis of cashew apple juice pectin requiring low temperature to act optimally.

Keywords: Cashew apple juice; pectin hydrolysis; Polygalacturonase; *Aspergillus aculeatus* URM4953; Thermodynamics; Kinetics.

3.1. Introdução

O cajueiro (*Anacardium occidentale*) é uma planta nativa ao bioma brasileiro caatinga. No entanto, atualmente, está amplamente disponível em vários países da Ásia, África e América central (BRITO; SILVA; RODIGUES, 2018). Esta planta produz um fruto comercializado em todo mundo, a castanha. Seu pseudofruto, o pedúnculo, conhecido como como caju, é um importante subproduto da indústria de processamento de castanha de caju, e devido ao seu conteúdo de vitaminas, açúcares, minerais, aminoácidos, fibra alimentar, ácido ascórbico, carotenóides, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos, é considerado um alimento funcional que apresenta alta atividade antioxidante (DAS; ARORA, 2017).

O suco de caju é amplamente consumido no Brasil, mas o aumento de sua participação no mercado externo depende da capacidade de melhorar tecnologicamente seu processamento (QUEIROZ et al., 2011). Alguns pesquisadores tem reportado alguns métodos de clarificação utilizando a microfiltração (BRON et al., 2005) e agentes clarificadores (DEDEHOU et al., 2015). No entanto, a pesquisa sobre a hidrólise enzimática da pectina em diferentes sucos ainda é muito escassa.

As poligalacturonases (EC 3.2.1.15 e EC 3.2.1.67) são as pectinases mais importantes na degradação da pectina, este substrato é um heteropolissacarídeo complexo constituído de moléculas longas e ricas em ácido α -D-galacturônico (KOZIOŁ et al., 2017). As PG's enzimas são de grande interesse comercial devido à sua ação hidrolítica na cadeia polimérica pectínica, que quebra as ligações glicosídicas α 1-4 (SOUZA et al., 2010). Apesar de serem amplamente utilizadas nas indústrias alimentícias para extração e clarificação de vinhos e sucos de frutas (SIEIRO et al., 2012; CERRETI et al., 2017), fermentação de café e chá (UENOJO; PASTORE, 2007) e extração de óleos vegetais (CHEN et al., 2018), elas podem ser usadas para degomagem de fibra (HABRYLO et al., 2018), indústria de papel (KOHLI; GUPTA, 2015) e tratamento de águas residuais (MAHESH et al., 2016).

No entanto, o uso da enzima livre em processos industriais não permite a sua recuperação, para múltiplos usos (MENDES et al., 2011). Deste modo, a imobilização facilita a aplicação e a reutilização do biocatalisador, permitindo a redução de custos. Algumas vantagens adicionais da imobilização enzimática são: o aumento da atividade enzimática, fácil recuperação da enzima após centrifugação ou filtração, heterogeneidade do sistema, rápida interrupção da reação e operação contínua nos diferentes biorreatores

(MA et al., 2017). Entre os vários suportes adotados para a imobilização enzimática, o alginato, um polissacarídeo biodegradável, é amplamente utilizado devido à sua boa biocompatibilidade, baixo custo, fácil disponibilidade e simples preparo (ZHOU; LI; LI, 2010).

Muitas pesquisas têm sido relatadas pela literatura investigando as características bioquímicas de enzimas industriais, uma vez que permitem obter informações sobre sua atividade ao longo do tempo (KOHLI; GUPTA, 2015), avaliar seu potencial biotecnológico (CASTRO et al., 2015a) e prever seu comportamento sob condições não testadas experimentalmente (EL-LOLY; AWAD; MANSOUR, 2007). No entanto, estas investigações foram usualmente realizadas utilizando reagentes de pectina cítrica ou ácidos galacturônicos, que apresentam alto conteúdo de pureza e grau analítico. Além disso, na maioria dos estudos cinéticos sobre a hidrólise da pectina, o material da pectina é preliminarmente isolado dos sucos de frutas, distanciando um pouco os experimentos da situação real (NINGA et al., 2018).

Muitos fatores podem influenciar e alterar o comportamento da enzima em um processo real, ou seja, a presença de alguns inibidores, íons e carboidratos no suco, pode afetar a atividade enzimática, pela ligação destes a o sítio catalítico da enzima ou reação com a estrutura desta biomolécula (PAN et al., 2015; TOUNSI et al., 2016). Além disso, os parâmetros cinéticos e termodinâmicos informam o mecanismo e o comportamento da reação, que são necessários para projetar reatores industriais com sucesso.

O caju é uma fruta nutritiva que necessita de atenção especial durante o processamento, pois sua composição química e características sensoriais podem ser afetadas por fatores físicos, químicos, bioquímicos e microbiológicos (DAS; ARORA, 2017). Então, a busca por enzimas com características especiais, como a baixa temperatura ótima de atuação, é muito importante para que a hidrólise da pectina em seu suco seja bem-sucedida.

Com base nisto, o presente trabalho teve como objetivo determinar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da hidrólise da pectina de suco de caju por meio da poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1 *Micro-organismo*

O *Aspergillus aculeatus* URM4953 foi obtido da micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. Este foi mantido em óleo mineral e reativado em solução nutritiva contendo 1% de peptona, 2% de glicose e 0,3% de extrato de levedura. Neste, o crescimento ocorreu a 30°C sob agitação de 120 rpm por 72h. Amostras do fungo já ativado foram coletadas e transferidas para frascos erlenmeyers de 125 mL contendo meio de cultura Czapek e incubados a 30°C por 7 dias para esporulação. Por fim, os esporos foram coletados com a adição de 3,0 mL de solução salina (0,9% de NaCl e 0,01% de Tween 80) previamente esterilizada. A concentração de esporos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

3.2.2 *Produção de poligalacturonase por fermentação submersa (FS)*

A poligalacturonase (EC 3.2.1.15) (PG) foi produzida pelo *A. aculeatus* URM4953 em fermentação submersa utilizando farinha de casca de maracujá segundo método de Fontana, Polidoro, e Silveira (2009). Uma suspensão a 3% de farinha de casca de maracujá em água deionizada foi autoclavada por 20 min a 121°C e 1 atm para extrair a pectina e açúcares redutores presentes na farinha. Após extração, a mistura foi filtrada para remover os sólidos suspensos. Em seguida, sais (0,7mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,8mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 5mM de K_2HPO_4) e 10 mg/mL de extrato de levedura foram adicionados ao meio. O meio novamente esterilizado em autoclave. Com isto, o meio foi inoculado a uma concentração de 10^5 esporos/mL e a fermentação foi realizada a 30°C em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio, sob agitação de 130 rpm durante 96h. O fermentado foi filtrado e centrifugado durante 5 min a 4000 rpm. O sobrenadante, denominado extrato bruto enzimático, foi coletado e armazenado sob congelamento (-20°C).

3.2.3 Atividade enzimática

A atividade da poligalacturonase foi determinada pelo método proposto por Miller (1959). Neste, 500 µg de pérolas de alginato, contendo a enzima imobilizada, foram incubados com 500 µl de pectina cítrica (10 mg/mL) em tampão acetato pH 4,5 a 50°C por 40 min. Uma alíquota de 100 µl foi coletada e misturada com 1,0 mL do reagente DNSA, uma solução constituída por ácido 3,5-dinitrosalicílico a 1,0%, NaOH a 0,4 M e $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 30%. A mistura foi mantida sob ebulição durante 5 min e arrefecida em banho de gelo. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro UV-Vis, modelo SP-1105, (Spectrum, Curitiba, Brasil), a 540 nm contra o branco. Os dados foram plotados em uma curva padrão ($y = 0.0166 + 0.0842 x$; $R^2 = 0.999$) de densidade óptica versus concentração de ácido α -D-galacturônico como açúcar redutor. Uma unidade de atividade da PG foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol por mL de ácido galacturônico por minuto ($U = \mu\text{mol/mL/min}$).

3.2.4 Imobilização covalente da poligalacturonase em pérolas de alginato de cálcio

A imobilização do PG foi realizada utilizando alginato de sódio como suporte e o glutaraldeído como agente de ligamento. A solução de alginato de sódio 0,09 M foi lentamente gotejada em uma solução de cloreto de cálcio 0,3 M sob agitação. As pérolas formadas foram endurecidas durante 30 min a 4°C e então lavadas com água deionizada. Para ativação, as pérolas de alginato de cálcio foram submergidas em solução de glutaraldeído 0,2 M durante 2 h à temperatura ambiente e agitadas a 120 rpm. As pérolas ativadas foram então lavadas com água deionizada e a remoção completa do glutaraldeído foi verificada por espectrofotometria a 245 nm. Em seguida, elas foram adicionadas a uma solução de extrato bruto (0,011 mg/mL de proteína), a uma proporção de 1 g de pérolas para cada mL de extrato bruto enzimático, por 45 min em temperatura ambiente a 120 rpm. Então, as pérolas foram lavadas com água deionizada, secas em peneira e armazenadas a 4°C em recipientes hermeticamente fechados.

3.2.5 Determinação da concentração de pectina

A concentração de pectina presente no suco de caju foi determinada pelo método de McComb; McCreedy, (1952) com algumas modificações. Neste, 50 μL do suco de caju foi desesterificado pelo uso de uma solução 0,05 M de NaOH. Em seguida, foi acrescido 6 mL de H_2SO_4 , previamente resfriado em banho de gelo. A mistura formada foi mantida 10 minutos em banho de água fervente. Posteriormente, 500 μL da solução de carbazol a 0,15% foram adicionados e a reação foi estabilizada durante 30 min à temperatura ambiente, a pectina foi medida, em mg/mL de açúcares redutores, em espectrofotômetro UV-Vis, com uso de curva de calibração $y = 0,3429x - 0,1911$ ($R^2 = 0,996$), utilizando o ácido α -D-galacturônico como padrão.

3.2.6 Cinética de degradação da pectina em suco de caju

O Suco de caju foi obtido pela trituração deste em liquidificador, seguido de filtração em peneira para remover os resíduos sólidos remanescentes, seguindo para armazenamento a -20°C até o uso. A hidrólise da pectina foi realizada misturando 1,0 g das pérolas de alginato de cálcio, contendo a PG imobilizada, para cada 5mL de suco de caju (contendo 30% do suco integral de caju, tendo-se uma concentração de pectina de 163 mg/mL). A mistura foi submetida a agitação sob diferentes temperaturas durante 2h. Para determinar a temperatura ótima de hidrólise da pectina em suco de caju, a velocidade de hidrólise pela PG imobilizada foi analisada em uma faixa de temperatura de 10 - 50°C . Para fins comparativos, a taxa de reação foi expressa como a atividade relativa percentual, em relação ao seu valor máximo.

A velocidade de reação foi determinada pela equação:

$$v = \frac{[S]_f - [S]_i}{t_f - t_0} \quad (\text{Eq. 15})$$

Onde $[S]_i$ é a concentração inicial de açúcar redutor no início da reação (t_0) e $[S]_f$ o teor de açúcar redutor final (t_f).

A cinética de degradação da pectina de suco de caju ao longo do tempo (120 min), em intervalos de 10 min, foi determinada a 20, 40 e 50°C , através do fitting da curva

obtida pelo os dados experimentais usando a equação de Ghose-Walseth (VALLDEPERAS et al., 2000), através do software Origin 8.0 ((OriginLab, Northampton, MA, EUA):

$$P = kt^m \quad (\text{Eq. 16})$$

Onde P é a concentração de açúcar redutor (mg /mL) num dado tempo t (minuto), k é a constante cinética, e m o parâmetro característico do complexo enzima-substrato estudado.

3.2.7 Caracterização Físico-Química do suco

Foram analisados os sólidos solúveis totais (SST), medidos usando um refratômetro manual e expressos em °Brix, o pH, que foi medido por meio de um medidor digital de pH (Tecnal, Piracicaba, Brasil), a cor do suco de caju foi determinada pela medição da absorbância a 420 nm (RAI; DE, 2009) usando o mesmo espectrofotômetro mencionado anteriormente.

3.3. Teoria

3.3.1. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da ação da PG sobre a pectina do suco de caju

Os parâmetros cinéticos de reação catalisada pela PG imobilizada foram determinados em diferentes temperaturas (20, 40 e 50°C) e concentrações de pectina (27-190 mg/mL), com o objetivo de determinar a concentração de pectina em suco de caju onde se obtenha a velocidade máxima de catálise (V_{max}) que satisfaça a proporção de 1 g de PG imobilizada em esferas de alginato para cada 5 mL de suco de caju (Seção 3.2.5).

Por um mecanismo distinto das enzimas multiméricas, algumas enzimas monoméricas (como as PG's) exibem uma resposta não michaeliana, ou seja, apresentam um desvio da curva hiperbólica, da cinética enzimática, para um modelo sigmoidal que

pode ser estudada de acordo com Hill, (1910). Tal modelo assume que a enzima pode ter múltiplos substratos ou sítios de ligação, e que uma enzima pode sofrer uma mudança conformacional ou elétrica quando ligada a uma molécula de substrato, alterando assim a afinidade dos outros sítios catalíticos disponíveis, este fenômeno é chamado de cooperatividade (NINGA et al., 2018).

Segundo Porter e Miller (2012), a cooperatividade correlaciona uma variedade de mecanismos catalíticos e a influência nas propriedades termodinâmicas e cinéticas da enzima. Para enzimas que exibem múltiplos sítios de ligação, tais efeitos são observados pela afinidade de uma nova ligação de ligando (molécula de substrato) que ocupa um sítio estrutural distinto. Por outro lado, a cooperatividade também pode ocorrer no sítio de ligação de ligante único, devido a uma alteração induzida no único sítio catalítico.

A hidrólise de pectina pela PG pode ser descrita pelo seguinte esquema geral:



Onde E é a enzima, S o substrato, n o número de Hill que é o número de sítios de ligação e assim representando a cooperatividade, ES é o complexo enzima-substrato e P_d o produto. k_a e k_d são constantes de primeira ordem de associação e dissociação (do complexo enzima-substrato) no equilíbrio de hidrólise, respectivamente. A constante k_a corresponde a afinidade da enzima e pode ser representada pela Eq. 18 (NIHEI; NODA; MORALES, 1961):

$$k_a = \frac{[ES]}{[P][S]^n} \quad (\text{Eq. 18})$$

Então, quanto maior for a concentração de ES , maior é k_a , conseqüentemente, maior é a afinidade.

Assumindo um estado estacionário, a fração de sítios ativos ocupados (θ) é definida como a razão entre a concentração de sítios ativos ligados e a concentração total de enzima nas formas livre e ligada ao substrato (NOOR et al., 2013):

$$\theta = \frac{[ES]}{[ES] + [E]} \quad (\text{Eq. 19})$$

Substituindo-se $[ES]$ descrito na Eq. 17 na Eq. 18, tem-se:

$$\theta = \frac{[S]^n}{[S]^n + \frac{1}{k_a}} \quad (\text{Eq. 20})$$

Onde, $1/k_a$ é igual à constante de dissociação k_d . Então, rearranjando e expressando em forma logarítmica, obtém-se a equação de Hill linearizada:

$$\log \left[\frac{\theta}{1-\theta} \right] = n \log[S] - \log k_d \quad (\text{Eq. 21})$$

No entanto, uma versão modificada da equação de Michaelis-Menten (Eq. 22), ou na sua forma linearizada (Eq. 23), baseadas na formulação desenvolvida por Hill, é preferida para fins experimentais:

$$v = \frac{V_{max}[S]^n}{k_{0.5}^n + [S]^n} \quad (\text{Eq. 22})$$

$$\log \left[\frac{v}{V_{max}-v} \right] = n \log[S] - n \log k_{0.5} \quad (\text{Eq. 23})$$

Onde a velocidade de reação máxima (V_{max}), a concentração do substrato quando a taxa de reação é metade do seu valor máximo ($K_{0.5}$) e o número de Hill (n) foram calculados através do fitting da curva no software Origin 8.0 (OriginLab, Northampton, MA, EUA), dos dados experimentais da velocidade de reação plotados em função à concentração de pectina de acordo com a Eq. 23.

Os parâmetros cinéticos, restantes, e os termodinâmicos (energia de ativação, variação de entalpia padrão de equilíbrio, constante catalítica, energia livre de Gibbs de ativação, entalpia e entropia) da reação de hidrólise da pectina de suco de caju foram determinados e analisados como descrito na seção 2.3 do capítulo 1 deste trabalho.

3.4. Resultados e discussão

3.4.1 Temperatura ótima e parâmetros cinéticos da hidrólise da pectina

Como visto no capítulo 1 nos estudos utilizando a pectina cítrica como substrato, a PG livre do *Aspergillus aculeatus* URM4953 apresentou uma temperatura ótima de 50°C. Enquanto que, quando imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio apresentou uma queda na temperatura ótima para 40°C, mas garantiu a retenção de mais de 90% de sua atividade inicial após 60 min a esta temperatura. Além disso, os parâmetros termodinâmicos da termoinativação da PG imobilizada sugeriram um

mecanismo predominante de desdobramento reversível, permitindo quatro ciclos sucessivos de uso da enzima imobilizada com apenas 34% de perda de atividade a 50°C por 40 min.

No entanto, ao contrário dos resultados apresentados com a pectina cítrica (que foi o substrato utilizado em todos os estudos do capítulo 1), o suco de caju contém muitos outros compostos que podem influenciar a hidrólise da pectina pela PG. Por este motivo, para encontrar as melhores condições de hidrólise da pectina no suco de caju, a reação foi estudada em diferentes temperaturas de 10 a 50°C, cujos resultados estão ilustrados na Fig. 3.1 em termos de atividade relativa.

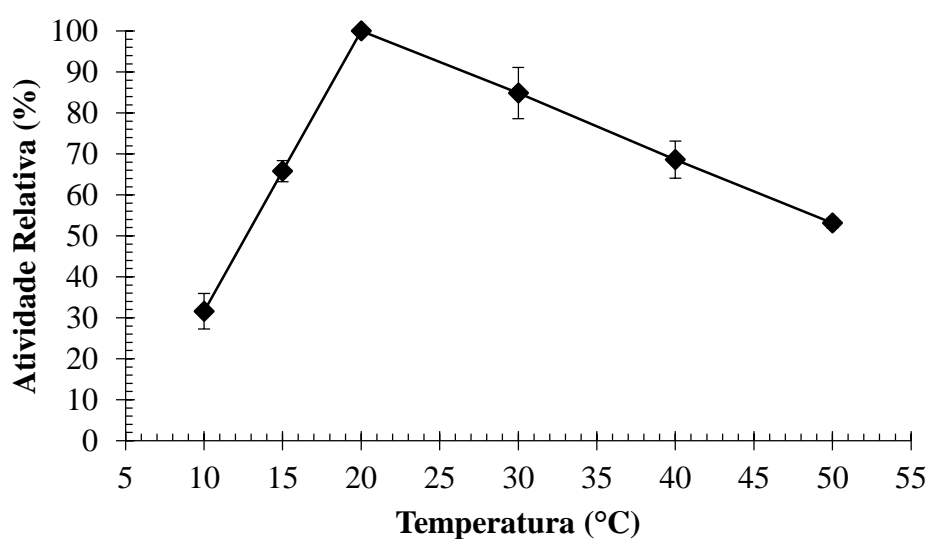


Fig. 3.1. Temperatura ótima de hidrólise da pectina de suco de caju pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio.

A hidrólise da pectina de suco de caju pela PG imobilizada apresentou máxima catálise a 20°C, o que permitiu reduzir ainda mais os custos do processo, quando comparado com os resultados no reagente analítico. Além disso, como mencionado anteriormente, uma vez que o caju contém vários compostos bioativos termolábeis como vitaminas, açúcares, aminoácidos, ácido ascórbico, carotenóides, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos (DAS; ARORA, 2017), a possibilidade de trabalhar praticamente à temperatura ambiente permitiria preservar seu alto valor nutricional.

As poligalacturonases são conhecidas por apresentarem temperatura ótima em torno de 50°C (KASHYAP et al., 2001; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005; KOHLI; GUPTA, 2015). No entanto, algumas linhagens de *Aspergillus* podem apresentar menor temperatura ótima da PG, como a PG do *Aspergillus niger* que apresentou temperatura

ótima de 37°C (BUSTAMANTE-VARGAS et al., 2015), 40°C para a do *Aspergillus flavus* MTCC7589 (ANAND; YADAV; YADAV, 2017) e *Aspergillus ibericus* (MAHESH et al., 2016).

Devido à alta quantidade de pectina presente no suco de caju uma cinética enzimática modelada pela equação de Hill foi realizada (Fig. 3.2) para encontrar a concentração adequada de pectina correspondente à velocidade máxima de catálise, nas temperaturas de 20°C (temperatura ótima de hidrólise da pectina de suco de caju), 40°C e 50°C (temperaturas ótimas da enzima imobilizada e livre na pectina cítrica, respectivamente).

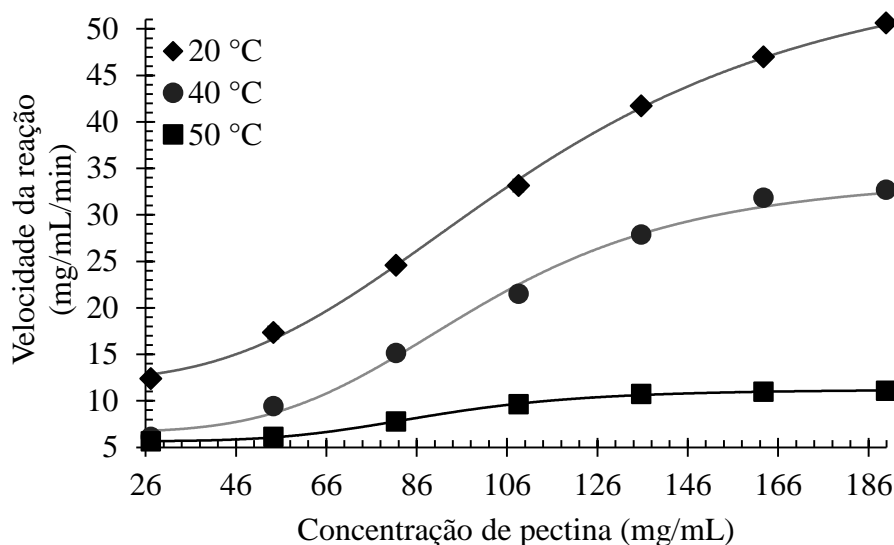


Fig. 3.2. Influência da concentração de pectina na taxa de hidrólise da pectina de suco de caju pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalente em pérolas de alginato de cálcio.

As (Fig. 3.2) foram ajustadas a equação de Hill (Eq. 22) com altos coeficientes de determinação (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Parâmetros cinéticos da hidrólise da pectina de suco de caju pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio.

T (°C)	Influência da concentração de pectina na velocidade de hidrólise					Cinética de degradação da pectina	
	V_{max} (mg/ml/min)	$k_{0.5}$ (mg/mL)	k_{cat} (s ⁻¹)	n	R^2	Modelo	R^2
20	58,2	113,0	166,2	3	0,999	$P = 0,765t^{383}$	0,910
40	34,3	101,0	98,0	4	0,995	$P = 7,8 \cdot 10^{-4}t^{174}$	0,962
50	11,3	89,7	32,1	5	0,999	$P = 3 \cdot 10^{-4}t^{162}$	0,989

Como é de conhecimento geral, o efeito alósterico nas enzimas causado pela cooperatividade envolve múltiplos substratos ou múltiplos sítios de ligação. As moléculas enzimáticas podem sofrer alterações estruturais ou eletrônicas (FENG et al., 2015), que pode resultar em alteração da afinidade das moléculas de substratos pelos locais vagos remanescentes. No entanto, a cooperatividade também pode ocorrer em proteínas monoméricas com um único local de ligação (ROSE; WARMS; YUAN, 1993; NINGA et al., 2018).

Embora as poligalacturonase sejam usualmente descritas na literatura como proteínas monoméricas, com uma hélice β -paralela e três folhas β distintas compostas por 8 a 10 voltas completas (KOHLI; GUPTA, 2015), muitas delas, das mais distintas fontes, apresentam pelo menos dois sítios de ligação (PALANIVELU, 2006). O que poderia refletir em uma cooperatividade por ambos os mecanismos mencionados.

Segundo Ninga et al. (2018), o efeito alostérico da PG imobilizada pode ser explicado pela presença de alguns compostos de ocorrência natural que podem atuar como ativadores ou inibidores nos diferentes mecanismos possíveis de clivagem da pectina, sendo responsável por esse desvio ao modelo michaeliano. A quebra da molécula pectica nas diferentes regiões de ligações glicosídicas ao longo da cadeia polimérica, pode levar a formação de vários produtos distintos. Neste processo, a pectina pode se ligar ao sítio ativo catalítico da PG, liberando um único monômero, enquanto, que o oligômero restante, pode formar um novo complexo, enzima-substrato, não produtivo atuando como um inibidor para outros substratos ou produtivo que irá propiciar a formação de novos produtos. Além disso, pode ocorrer que o substrato se ligue a enzima em determinado sítio de ligação, formando um complexo não produtivo, trazendo um efeito inibitório, enquanto que sua ligação a outro sítio de ligação diferente pode levar a um complexo produtivo.

Os valores da constante de afinidade ($K_{0,5}$), constante catalítica (k_{cat}), número de Hill (n) e taxa máxima de reação (V_{max}) da degradação da pectina pela PG imobilizada, a diferentes temperaturas estão listados na Tabela 3.1.

O número de Hill, aumentou progressivamente de 3 para 5 com aumento da temperatura de 20 para 50°C (Tabela 3.1), o que indica o aumento da cooperatividade positiva. Este parâmetro, representa o principal índice utilizado para indicar o grau de cooperatividade, indicando o número de ligações efetivas realizada ao longo da estrutura macromolecular das proteínas que sofrem cooperatividade termodinâmica (RICARD; NOAT, 1985; NINGA et al., 2018). Quando $n = 1$, o sistema é classificado como não

cooperativo e é descrito pelo modelo cinético de Michaelis-Menten; por outro lado, quando $n < 1$ o sistema apresenta cooperatividade negativa, pois a associação do substrato com a molécula proteica reduz a velocidade de reação, enquanto o contrário ocorre quando $n > 1$ (cooperatividade positiva) (PORTER; MILLER, 2012).

O fenômeno de cooperatividade positiva sugere que na ausência de substrato a conformação molecular de baixa afinidade é favorecida, o que significa que, quando o substrato se liga a enzima, dois comportamentos distintos e dependentes da concentração do substrato ocorrem. Por um lado, em alta concentração de substrato, a catálise ocorre liberando produtos a uma elevada taxa e o estado de alta afinidade é regenerado para um segundo ciclo de catálise, assim, uma tendência hiperbólica característica da cinética não michaeliana é observada. Por outro lado, a baixa concentração de substrato a enzima relaxa lentamente para a conformação de baixa afinidade antes que outra molécula de substrato tenha tempo suficiente para se ligar-se enzima; portanto, a falha na ligação do substrato é responsável por gerar a resposta cinética não-Michaelis-Menten (RICARD; NOAT, 1985; PORTER; MILLER, 2012), como foi observado na Fig. 3.2. Na faixa de concentração de pectina de 26 a 86 mg/mL, a taxa de reação aumentou lentamente o que gerou as curvas sigmoidais. Segundo Cárdenas, Rabajille e Niemeyer, (1984) a cooperatividade positiva pode ocorrer devido a um mecanismo que envolve conformações de alta e baixa afinidade da enzima, que estão em equilíbrio na ausência de substrato; no entanto, a ocorrência destes estados é controlada pela concentração de substrato.

A constante de afinidade ($K_{0,5}$) decaiu com o aumento da temperatura, logo, a afinidade da PG pela pectina foi maior para as temperaturas mais elevadas, uma vez que $K_{0,5}$ é inversamente proporcional a afinidade da enzima pelo seu substrato (RIAZ et al., 2012). A 20°C a PG imobilizada apresentou a menor afinidade associada ao maior valor de V_{max} , isto pode ser atribuído a influência de outras enzimas presentes no extrato bruto, que possivelmente foram imobilizadas em conjunto com a PG, o que poderia favorecer a velocidade de hidrólise. A mesma tendência foi observada para k_{cat} que diminuiu com o aumento da temperatura, sendo justificada pela mesma linha de raciocínio anterior, apresentada para V_{max} .

Além disso, com a maior presença de contaminantes no suco de caju, é possível que alguns outros polissacarídeos tenham atuado como inibidores competitivos da PG imobilizada (CORNISH-BOWDEN, 2013), formando um complexo não produtivo como

descrito anteriormente, o que justificaria a afinidade reduzida quando comparado com os resultados com a pectina cítrica (capítulo 1).

O V_{max} exibiu seu maior valor (58,2 mg/mL/min) a 20°C (Tabela 3.1) e diminuiu progressivamente com o aumento da temperatura. Tal decaimento pode estar relacionado à termorresistência da enzima, uma vez que altas temperaturas podem ter favorecido o processo de desnaturação a ponto de afetar a reação enzimática após 2 h de processamento do suco.

A Tabela 3.1 apresenta os modelos cinéticos de hidrólise da pectina de suco de caju em função do tempo. Como é possível ver na Fig. 3.3, a concentração de açúcares redutores aumentou progressivamente. Tal comportamento foi bastante semelhante nas três temperaturas analisadas, sendo mais pronunciado a 20°C, devido à maior velocidade de hidrólise. Os modelos apresentaram altos ajustes e foram úteis para prever a degradação da pectina (Tabela 3.1) (Fig. 3.3).

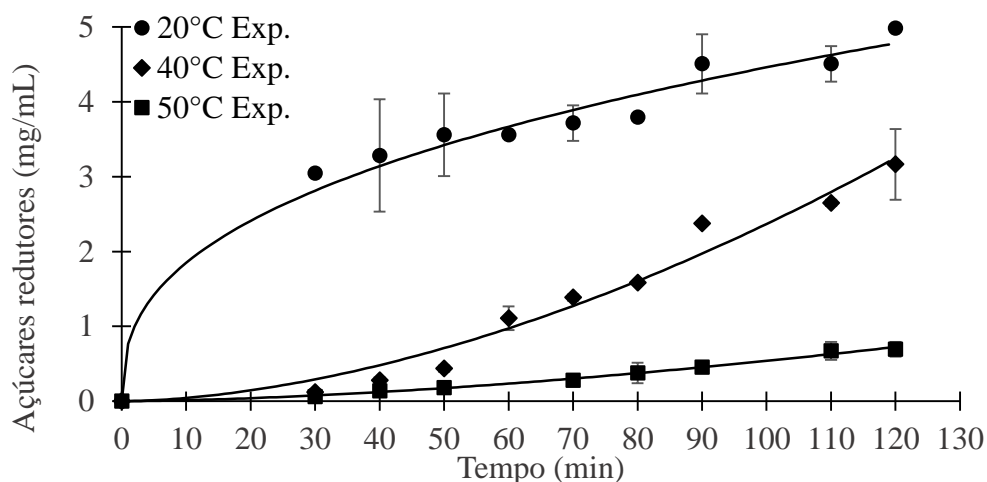


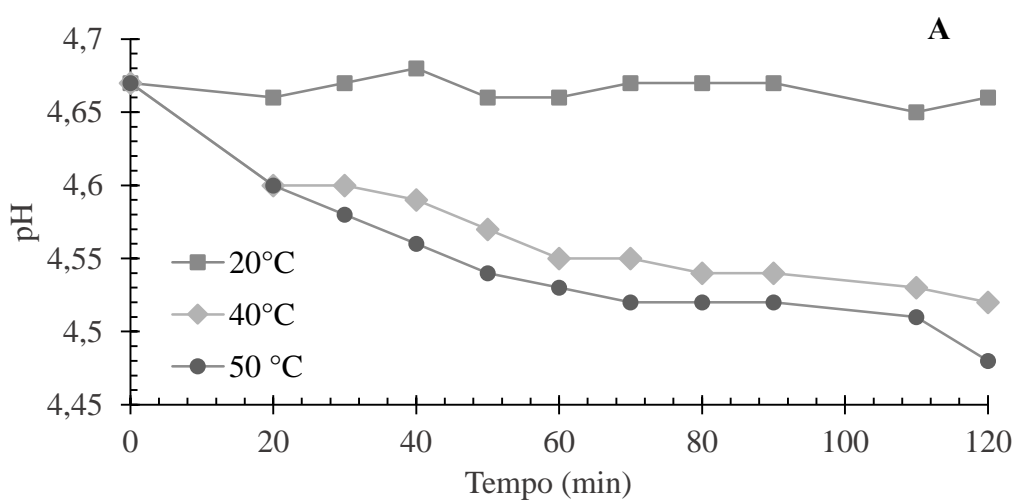
Fig. 3.3. Cinética de biodegradação da pectina de suco de caju (pela PG de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio) adaptada aos modelos de Ghose-Walseth, em diferentes temperaturas.

Algumas modelagens cinéticas foram relatadas pela literatura usando a equação empírica cinética de Ghose-Walseth. (Wang et al., 2007; Valdeperas et al., 2000) investigaram a cinética de degradação da pectina em tecidos de algodão e fibras de liocel, respectivamente. Eles observaram que a constante cinética (k) aumentou a medida que o parâmetro característico do complexo Pectina-PG (m) aumentou, sendo que este sofreu uma redução em maiores concentrações de substrato. A mesma tendência foi observada nesta pesquisa, mas o m diminuiu com o aumento de temperatura.

3.4.2 Caracterização físico-química do suco

Para fins comparativos analisou-se a evolução do pH, cor e sólidos solúveis totais, ao longo do tempo de ação da PG imobilizada a diferentes temperaturas. Considerando que a 20°C o pH do suco foi de $4,67 \pm 0,01$ com pequenas variações (Fig. 3.4A), diminuiu progressivamente para 4,52 a 40°C e 4,48 a 50°C.

A intensidade da cor expressa como absorvância a 420 nm aumentou progressivamente, especialmente na temperatura mais alta (Fig. 3.4B), provavelmente devido à presença de polifenol oxidases no suco de caju. Na presença de oxigênio, essas enzimas são capazes de catalisar a oxidação de orto-difenóis em orto-quinonas, resultando em produtos de quininas, que são altamente reativos e polimerizam gerando substâncias coloridas (BOUCHAIB et al., 2018), afetando assim a qualidade alimentar em termos de cor, sabor e valor nutricional (PANADARE; RATHOD, 2018). Para evitar esse fenômeno pode-se realizar um branqueamento antes de processamento do suco. Os valores de sólidos solúveis totais (Fig. 3.4C) diminuíram durante o processo de hidrólise, para 20°C (8,9-4,4 °Brix), 40°C (8,9-4,4 °Brix) e 50 ° C (8,9-6,6 °Brix), o que ocorreu provavelmente foi um processo de absorção de açúcares redutores, pelos poros presentes nas pérolas de alginato, durante o processo de hidrólise da pectina (GULEC; BAGCI; BAGCI, 2018). A mesma tendência foi observada por Oliveira et al. (2018) que clarificou os sucos de maçã e umbu usando pectinases imobilizadas por aprisionamento em pérolas de alginato e observou um decaimento dos SST após a clarificação.



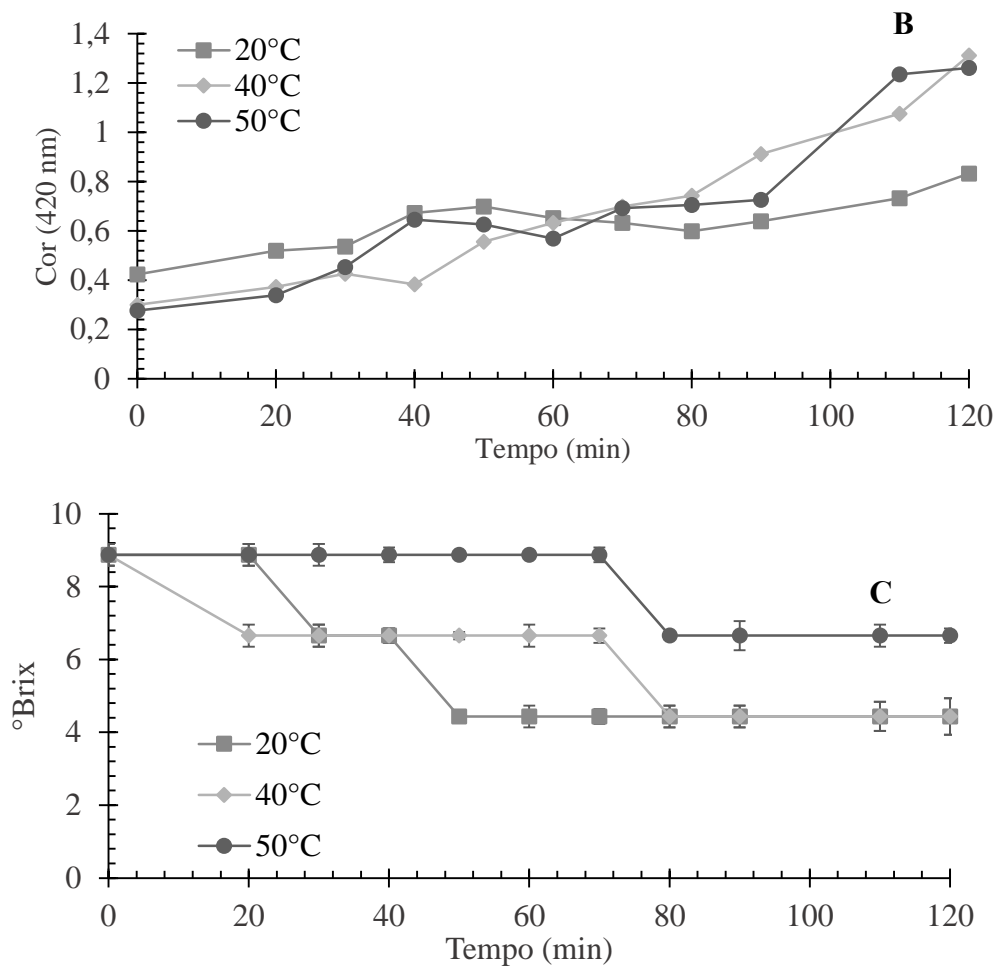


Fig. 3.4. Evolução ao longo do tempo do (A) pH, (B) cor e (C) sólidos solúveis totais (SST), durante o tratamento enzimático do suco de caju pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato de cálcio.

3.4.3 Termodinâmica da hidrólise de pectina em suco de caju

A energia de ativação de degradação da pectina ($E^* = 80,31$ kJ/mol) e a variação de entalpia padrão do desdobramento da PG imobilizada ($\Delta H_u^0 = 16,57$ kJ/mol) foram estimadas a partir de gráficos semi-log da atividade enzimática inicial (k_o) versus $1/T$, na faixa de temperatura 10-50°C (Fig. 3.5).

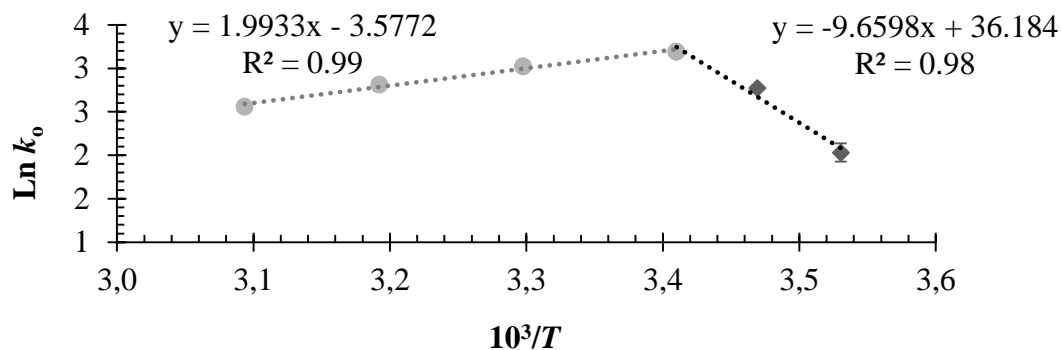


Fig. 3.5. Gráfico semi-log de Arrhenius da atividade inicial da poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em alginato de cálcio, em suco de caju versus o inverso da temperatura.

O valor de E^* é próximo ao de muitas outras pectinases, vale ressaltar que valores pequenos são desejados em aplicações industriais, porque favorecem cineticamente as reações catalisadas por enzimas e os custos energéticos são menores. Por outro lado, o valor de ΔH_u^0 encontrado é menor do que o estimado anteriormente (42,52 kJ/mol), no capítulo 1, para a hidrólise de pectina cítrica a 20 mg/mL. O que significa que a forma desdobrada da enzima imobilizada neste caso é mais estável, ou seja, na reação no suco de caju o desdobramento da enzima é menos pronunciado. Este fenômeno pode ser atribuído não apenas a composição distinta do meio, que obviamente exerce uma influência no desdobramento da enzima, mas também a diferença na concentração do material péctico de 163 mg/mL para o suco de caju e 20 mg/mL para a maior concentração de pectina cítrica estudada, gerando um efeito protetor da estrutura da enzima. A proteção oferecida pelo substrato, parece ser uma característica geral das diferentes classes de enzimas, sendo isto já relatado, como um fator influenciador dos parâmetros termodinâmicos de reação e de termoinativação da glicose isomerase (CONVERTI; DEL BORGHI, 1997; CONVERTI A., 1998; PALAZZI; CONVERTI, 1999, 2001). Infelizmente, nenhuma outra comparação com os dados da literatura é possível, porque a maioria dos estudos relata os valores de E^* e ΔH_u^0 são estimados em pectina cítrica isolada e parcialmente purificada, o que constitui um sistema completamente diferente.

A energia livre de Gibbs de ativação (ΔG^*), entalpia (ΔH^*) e entropia (ΔS^*) da hidrólise da pectina foram estimadas nas temperaturas de 20, 40 e 50°C (Tabela 3.2). Pode-se observar que ΔG^* claramente aumentou com a temperatura, apontando uma maior barreira energética e então uma desaceleração da hidrólise da pectina de suco de caju (RIAZ et al., 2007).

Tabela 3.2. Parâmetros termodinâmicos da hidrólise da pectina de suco de caju pela poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato.

T (°C)	ΔG^* (kJ/mol)	ΔH^* (kJ/mol)	ΔS^* (J/k.mol)
20	59,3	77,9	63,4
40	64,9	77,7	40,9
50	70,0	77,6	23,5

O aumento na temperatura levou uma pequena redução no ΔH^* , o que significa, assumindo que as variações sejam significativas, que o complexo enzima-substrato formado durante a reação é mais eficiente (RIAZ et al., 2007), à medida que o número de Hill aumentou de 3 a 20°C para 5 a 50°C. Esses resultados corroboram com o proposto de Atkinson e Walton, (1965), de que a forma mais frequentemente encontrada de cooperatividade pode ser explicada pela termodinâmica de ligação do substrato a enzima, pois a associação inicial da molécula de substrato pode alterar a afinidade de um evento subsequente de ligação, o que justificaria um aumento da estabilidade do complexo enzima-substrato, com o aumento da cooperatividade.

O ΔS^* está relacionado ao grau de rigidez do complexo enzima-substrato. O da temperatura levou a uma notável diminuição desse parâmetro termodinâmico de 63,4 para 23,5 J/mol.K. Enquanto esta diminuição sugere uma estrutura mais ordenada do estado de transição a altas temperaturas, o sinal positivo de todos os valores de ΔS^* indica que a estrutura do complexo enzima-substrato no estado de transição foi menos ordenada do que no sistema reagente (XIONG et al., 2005; RAJOKA, 2007).

3.5. Conclusão

A cinética enzimática de hidrólise da pectina de suco de caju pela PG de *Aspergillus aculeatus* URM4953, imobilizada covalentemente em pérolas de alginato, apresentou um comportamento alostérico responsável pela cooperatividade positiva, seguindo assim o modelo de Hill. Apesar do aumento no número de Hill com o aumento da temperatura, V_{max} , k_{cat} e $K_{0,5}$ alcançaram seus valores máximos a 20°C, correspondendo ao mesmo tempo a maior taxa de reação e a menor afinidade da PG pela pectina. O modelo cinético empírico de Ghose-Walseth mostrou-se adequado para prever a hidrólise da pectina no suco de caju durante 120 minutos de reação. Além disso, a caracterização físico-química do suco não apresentou alteração significativa do seu perfil de pH durante

120 min de catálise, mas com notável redução dos SST e elevação de intensidade da cor. A enzima imobilizada sofreu baixo efeito de desdobramento (ΔH_u^o) durante a hidrólise da pectina de suco de caju. Apesar de apresentar uma pequena variação na eficiência de formação do complexo PG-pectina (ΔH^*), formando um complexo mais estável a altas temperaturas, na temperatura de 20°C foi necessário menos energia (ΔG^*) para uma maior hidrólise, indicando uma maior espontaneidade da reação a baixas temperaturas. Além disso, devido à alta hidrólise a em temperaturas mais baixas, a formação de complexo PG-pectina mais ordenado (ΔS^*) foi observada a 50°C. Estes resultados tomados em conjunto são bastante promissores, pois, sugerem a possibilidade de explorar industrialmente o uso desta PG, evitando custos energéticos adicionais relacionados a temperaturas de aquecimento.

3.6. Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da FACEPE (Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Recife, Brasil), da CAPES (Conselho Nacional de Aperfeiçoamento da Educação Superior, Brasília, Brasil) e do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Referências

- ANAND, G.; YADAV, S.; YADAV, D. Purification and biochemical characterization of an exo-polygalacturonase from *Aspergillus flavus* MTCC 7589. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 264–269, 2017.
- ATKINSON, D. E.; WALTON, G. M. Kinetics of regulatory enzymes. **The Journal of biological chemistry**, v. 240, p. 757–764, 1965.
- BOUCHAIB, A.; ABDELLAH, A. Ben; BAKKALI, M.; LAGLAOUI, A.; ARAKRAK, A.; CARBONI, C.; BENJOUAD, A.; MAURADY, A. Optical method for detecting oxygen via the chromogenic reaction catalyzed by polyphenol oxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 114, p. 1–6, 2018.
- BRITO, E. S.; SILVA, E. O.; RODIGUES, S. Caju—*Anacardium occidentale*. **Exotic Fruits**, p. 85–89, 2018.

BRON, I. U.; RIBEIRO, R. V.; AZZOLINE, M.; MACHADO, E. C.; JACOMINO, A. P. Chlorophyll fluorescence emission and its relation to skin color and firmness during ripening of guava fruit. **Fruits**, v. 60, p. 25–32, 2005.

BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; OLIVEIRA, D.; NYARI, N. L. D.; VALDUGA, E.; SOARES, M. B. A.; BACKES, G. T.; DALLAGO, R. M. In situ immobilization of commercial pectinase in rigid polyurethane foam and application in the hydrolysis of pectic oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 35–43, 2015.

CÁRDENAS, M. L.; RABAJILLE, E.; NIEMEYER, H. Suppression of kinetic cooperativity of hexokinase D (glucokinase) by competitive inhibitors: A Slow transition model. **European Journal of Biochemistry**, v. 145, p. 163–171, 1984.

CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; ALBERNAZ, J. R. M.; SOARES, M. H.; SATO, H. H. A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 199–207, 2015.

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

CHEN, F.; JIA, J.; ZHANG, Q.; YANG, L.; GU, H. Isolation of essential oil from the leaves of *Polygonum viscosum* Buch-ham. using microwave-assisted enzyme pretreatment followed by microwave hydrodistillation concatenated with liquid – liquid extraction. **Industrial Crops & Products journal**, v. 112, p. 327–341, 2018.

CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Simultaneous effects of immobilization and substrate protection on the thermodynamics of glucose isomerase activity and inactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 511–517, 1997.

CONVERTI A., D. B. M. Kinetics of Glucose Isomerisation To Fructose By Immobilized Glucose Isomerase in the Presence of Substrate Protection. **Bioprocess Engineering**, v. 18, p. 27–33, 1998.

CORNISH-BOWDEN, A. The origins of enzyme kinetics. **FEBS Letters**, v. 587, p. 2725–2730, 2013.

DAS, I.; ARORA, A. Post-harvest processing technology for cashew apple - A review. *Journal of Food Engineering*, v. 194, p. 87–98, 2017.

DEDEHOU, E. S. C. A.; DOSSOU, J.; AHOHUENDO, B.; SAIDOU, A.; AHANCHEDE, A.; SOUMANOU, M. M. Optimization of cashew (*Anacardium occidentale L.*) apple juice ' s clarification process by using cassava and rice starch. **Journal of Applied Biosciences**, v. 95, p. 8989–9002, 2015.

EL-LOLY, M.; AWAD, A.; MANSOUR, A. Thermal Kinetics Denaturation of Buffalo Milk Immunoglobulins. **International Journal of Dairy Science**, v. 2, n. 4, p. 292–302, 2007.

FENG, D.; XUE, Y.; LI, Z.; WANG, Y.; YANG, W.; XUE, C. Dielectric properties of myofibrillar protein dispersions from Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) as a function of concentration, temperature, and NaCl concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 166, p. 342–348, 2015.

FONTANA, R. C.; POLIDORO, T. A.; SILVEIRA, M. M. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 4493–4498, 2009.

GULEC, H. A.; BAGCI, P. O.; BAGCI, U. Performance enhancement of ultrafiltration in apple juice clarification via low-pressure oxygen plasma: A comparative evaluation versus pre-flocculation treatment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 511–517, 2018.

HABRYLO, O.; EVANGELISTA, D. E.; CASTILHO, P. V.; PELLOUX, J.; HENRIQUE-SILVA, F. The pectinases from *Sphenophorus levis*: Potential for biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 112, p. 499–508, 2018.

HILL, A. V. A new mathematical treatment of changes of ionic concentration in muscle and nerve under the action of electric currents, with a theory as to their mode of excitation. **Journal of Physiology**, v. 40, p. 190–224, 1910.

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

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

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

KOZIOŁ, A.; CYBULSKA, J.; PIECZYWEK, P. M.; ZDUNEK, A. Changes of pectin nanostructure and cell wall stiffness induced in vitro by pectinase. **Carbohydrate Polymers**, v. 161, p. 197–207, 2017.

MA, X.; WANG, D.; YIN, M.; LUCENTE, J.; WANG, W.; DING, T.; YE, X.; LIU, D. Characteristics of pectinase treated with ultrasound both during and after the immobilization process. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 1–10, 2017.

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

MCCOMB, E. A.; MCCREARY, R. M. Colorimetric Determination of Pectic Substances. *Analytical Chemistry*, v. 24, n. 10, p. 1630–1632, 1 out. 1952.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. D. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, p. 831–840, 2011.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426–428, 1 mar. 1959.

NIHEI, T.; NODA, L.; MORALES, M. F. Properties and equilibrium constant of the adenosine triphosphate-creatine transphosphoryla catalyzed Reaction*. **The Journal of biological chemistry**, v. 236, p. 3203–3209, 1961.

NINGA, K. A.; SENGUPTA, S.; JAIN, A.; DESOBGO, Z. S. C.; NSO, E. J.; DE, S. Kinetics of enzymatic hydrolysis of pectinaceous matter in guava juice. **Journal of Food Engineering**, v. 221, p. 158–166, 2018.

NOOR, E.; FLAMHOLZ, A.; LIEBERMEISTER, W.; BAR-EVEN, A.; MILO, R. A Note on the Decomposition of the Kinetics of Enzyme Action. **FEBS letters**, v. 587, p. 2772–2777, 2013.

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

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

PALAZZI, E.; CONVERTI, A. Generalized linearization of kinetics of glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase. **Biotechnology and bioengineering**, v. 63, p. 273–284, 1999.

PALAZZI, E.; CONVERTI, A. Evaluation of diffusional resistances in the process of glucose isomerization to fructose by immobilized glucose isomerase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 246–252, 2001.

PAN, X.; LI, K.; MA, R.; SHI, P.; HUANG, H.; YANG, P.; MENG, K.; YAO, B. Biochemical characterization of three distinct polygalacturonases from *Neosartorya fischeri* P1. **Food Chemistry**, v. 188, p. 569–575, 2015.

PANADARE, D.; RATHOD, V. K. Extraction and purification of polyphenol oxidase: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 431–437, 2018.

PORTER, C. M.; MILLER, B. G. Cooperativity in monomeric enzymes with single ligand-binding sites. **Bioorganic Chemistry**, v. 43, p. 44–50, 2012.

QUEIROZ, C.; DA SILVA, A. J. R.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 128–132, 2011.

RAI, P.; DE, S. Clarification of pectin-containing juice using ultrafiltration. **Current Science**, v. 96, p. 1361–1371, 2009.

RAJOKA, M. I. Kinetic parameters and thermodynamic values of β -xylosidase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2212–2219, 2007.

RIAZ, M.; PERVEEN, R.; JAVED, M. R.; NADEEM, H.; RASHID, M. H. Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 558–564, 2007.

RIAZ, M.; RASHID, M. H.; SAWYER, L.; AKHTAR, S.; JAVED, M. R.; NADEEM, H.; WEAR, M. Physiochemical properties and kinetics of glucoamylase produced from deoxy-D-glucose resistant mutant of *Aspergillus niger* for soluble starch hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 130, p. 24–30, 2012.

RICARD, J.; NOAT, G. Kinetic co-operativity of monomeric mnemonical enzymes: The significance of the kinetic Hill coefficient. **European Journal of Biochemistry**, v. 152, p. 557–564, 1985.

ROSE, I. A.; WARMS, J. V. B.; YUAN, R. G. Role of conformational change in the fumarase reaction cycle. **Biochemistry**, v. 32, n. 33, p. 8504–8511, 24 ago. 1993.

SIEIRO, C.; GARCÍA-FRAGA, B.; LÓPEZ-SEIJAS, J.; SILVA, A. F. Da; VILLA, T. G.; GARCÍA-FRAGA, B.; LÓPEZ-SEIJAS, J. Microbial pectic enzymes in the food and wine industry. In: Valdez, B. Food Industrial Processes – Methods and Equipment. Rijeka: **InTech**. 2012. p. 201–218.

SOUZA, R. L. a.; OLIVEIRA, L. D. S. C.; SILVA, F. L. H.; AMORIM, B. C. Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 987–992, 2010.

TOUNSI, H.; HADJ SASSI, A.; BEN ROMDHANE, Z.; LAJNEF, M.; DUPUY, J. W.; LAPAILLERIE, D.; LOMENECH, A. M.; BONNEU, M.; GARGOURI, A.; HADJ-TAIEB, N. Catalytic properties of a highly thermoactive polygalacturonase from the mesophilic fungus *Penicillium occitanis* and use in juice clarification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 56–66, 2016.

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

VALLDEPERAS, J.; CARRILLO, F.; LIS, M. J.; NAVARRO, J. A. Kinetics of Enzymatic Hydrolysis of Lyocell Fibers. **Textile Research Journal**, v. 70, p. 981–984, 2000.

WANG, Q.; FAN, X.; HUA, Z.; GAO, W.; CHEN, J. Degradation kinetics of pectins by an alkaline pectinase in bioscouring of cotton fabrics. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 572–575, 2007.

XIONG, Y.-H.; LIU, J.-Z.; SONG, H.-Y.; JI, L.-N.; LIU, J.-Z. Purification, kinetic and thermodynamic studies of a new ribonuclease from a mutant of *Aspergillus niger*. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 348–356, 2005.

ZHOU, Z. D.; LI, G. Y.; LI, Y. J. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 21–26, 2010.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A otimizada imobilização da poligalacturonase do *Aspergillus aculeatus* URM4953 por ligação covalente em pérolas de alginato de cálcio possibilitou sucessivos reusos com altas recuperações da atividade, garantindo não apenas uma boa eficiência, mas também, a possibilidade de diminuição dos custos de processo industriais. As caracterizações bioquímica, cinética e termodinâmica demonstraram o grande potencial da PG de *A. aculeatus* URM4953 para possíveis aplicações industriais de degradação da pectina, uma vez que a imobilização apresentou isoenzimas de pHs distintos, estabilidade e renaturação protéica em uma determinada faixa de temperatura. Além do mais, quando performada diretamente em suco de caju, os resultados cinéticos mostraram-se muito mais promissores com a ótima atividade de processamento do suco pela PG em temperaturas próximas a ambiente, o que possibilita evitar grandes gastos energéticos no processo e garantir mínima alterações indesejáveis no suco de caju. Em estudos futuros, esses parâmetros permitirão auxiliar a projeção de biorreatores processadores de materiais pécnicos pela enzima estudada na indústria de alimentos.

APÊNDICE I: OPTIMIZED EXTRACTION OF POLYGALACTURONASE FROM *Aspergillus aculeatus* URM4953 BY AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS PEG/CITRATE

Journal of Molecular Liquids 263 (2018) 81–88



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Liquids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/molliq



Optimized extraction of polygalacturonase from *Aspergillus aculeatus* URM4953 by aqueous two-phase systems PEG/Citrate

Jônatas de Carvalho Silva^a, Pedro Renann Lopes de França^b, Tatiana Souza Porto^{a,b,*}

^a Northeast Biotechnology Network, Federal Rural University of Pernambuco - UFRPE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife, Pernambuco 52171-900, Brazil
^b Federal Rural University of Pernambuco - Acadêmic Unit of Garanhuns, Avenida Bom Pastor, s/n - Boa Vista, Garanhuns, Pernambuco 55292-270, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 March 2018
 Received in revised form 21 April 2018
 Accepted 23 April 2018
 Available online 27 April 2018

Keywords:

Polygalacturonase
 Ammonium sulfate
 Aqueous two-phase systems
 Precipitation
 Purification
 Optimization

ABSTRACT

This study sets out to compare three techniques for extracting polygalacturonase (PG) from *Aspergillus aculeatus* URM4953, namely, precipitation by organic solvent (ethanol and acetone), precipitation by ammonium sulfate salt and extraction by aqueous two-phase systems (ATPS) PEG/Citrate using a factorial design 2⁴. Afterwards, a central composite design (CCD) was used to optimize PG extraction by ATPS. The variables studied were concentrations of PEG (C_{PEG}) and citrate (C_{CIT}), PEG molar mass (M_{PEG}) and pH. The responses analyzed were the partition coefficient (K), the activity yield (Y) and the purification factor (PF). The thermodynamic parameters of the optimized ATPS partition were estimated as a function of temperature. Among the techniques used, only the ATPS was able to pre-purify the PG (PF = 1.8) with an 85% yield. Optimization increased the PF value to 2.3. The best condition was 23% C_{CIT}, 19% C_{PEG}, with the M_{PEG} and pH set to 8000 g/mol and 8, respectively. The mathematical models of the CCD showed a high adjustment to predict the extraction of polygalacturonase from *Aspergillus aculeatus* URM4953 by ATPS. The thermodynamic parameters ΔG_m° (-3.15 kJ/mol), ΔH_m° (9.14 kJ/mol) and ΔS_m° (41.2 J/Kmol) of partition showed that the preferential migration of almost all proteins from the crude extract to the salt rich-phase by increasing the temperature was spontaneous, while the PG preferred the PEG-rich phase. The ATPS showed the best performance as a first step for pre-purifying the PG from *Aspergillus aculeatus* URM4953.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Polygalacturonases are the most important pectinolytic enzymes [1]. They are responsible for hydrolyzing the polymeric chain of the pectin molecule, a carbohydrate present on the cell wall in the middle lamella which confers tissue rigidity [2,3]. They are widely used in industrial processes such as the clarification of fruit juices [4] and wine [5]; oil extraction [6]; maceration of tea leaves and cotton fibers; and in treating water [7]. Such enzymes are found as an enzymatic complex which consists of different pectinolytic enzymes [8]. However, impurities must be separated so they do not cause changes in the characteristics of food or to cause a chemical reaction. Thus, purification methods are required to extract these proteins. Purification is one of the most expensive steps of the downstream process [9]. To use techniques which make extraction easy, lower costs and increase efficiency, it is important to obtain protein with high industrial applicability. The aqueous two-phase systems (ATPS), precipitation by using organic solvents [10] and ammonium

salt [11] are considered techniques of pre-purification which can extract enzymes at low cost.

Cold organic solvent precipitation has the advantages of easy scale-up and of being a relatively simple operation. However, it generally requires a multi-step fractionation, which not only is time-consuming, but also leads to the loss of protein activity as a result of the multistep centrifugation. In addition, the entire operation needs to be conducted at low temperatures, which will significantly increase the cost of purification [12]. Ammonium sulfate, (NH₄)₂SO₄, is often used for salting out extraction because of its high solubility, which allows for solutions of very high ionic strength. Other reasons for its frequent use are that the pure material is readily available at low cost. NH₄⁺ and SO₄²⁻ are at the ends of their respective Hofmeister series and have been shown to stabilize the structure of protein [13].

ATPS has been used as a first purification step since such systems let large amounts and different types of contaminants be removed by a simple and economical unit operation. Partition in ATPS presents many advantages over conventional methods for isolating and purifying proteins. Partition equilibrium is reached very fast and it can be applied in scale up [14]. Citrate is a biodegradable and non-toxic salt which is often used in ATPS and can be discharged into biological wastewater treatment plants [15]. Therefore, in this study we set out to perform a

* Corresponding author at: Northeast Biotechnology Network, Federal Rural University of Pernambuco - UFRPE, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife, Pernambuco 52171-900, Brazil.
 E-mail address: tatiana.porto@ufrpe.br (T.S. Porto).

APÊNDICE II: CLARIFICAÇÃO DO SUCO DE CAJÁ (*Spondias mombin* L.) UTILIZANDO PECTINASES DE *Aspergillus aculeatus* URM4953

REVISTA BRASILEIRA DE AGROTECNOLOGIA | ISSN 2317-3114

CLARIFICAÇÃO DO SUCO DE CAJÁ (*Spondias mombin* L.) UTILIZANDO PECTINASES DE *Aspergillus aculeatus* URM4953

*Clarification of Cajá juice (*Spondias mombin* L.) using pectinases from *Aspergillus aculeatus* URM4953*

Resumo:

No processo de clarificação de sucos de frutas, usar pectinases é importante para promover a redução da viscosidade. Esta redução proporciona a minimização de custos nos processos industriais. Assim, este trabalho objetivou clarificar o suco de Cajá (*Spondias mombin* L.) utilizando as pectinases de *Aspergillus aculeatus* URM4953 com auxílio de planejamento fatorial 2². O extrato enzimático apresentou atividades de 2,61 U/mL (poligalacturonase), 2,59 U/mL (endo-poligalacturonase), 7,02 U/mL (pectina liase) e 43,5 U/mL (pectina esterase). No processo de clarificação, as pectinases produzidas por *A. aculeatus* URM4953 reduziram a viscosidade do suco de cajá (89,1%) nas condições de 50°C durante 50 minutos. A análise estatística revelou que com exceção da viscosidade, as demais características físico-químicas não apresentaram efeitos significativos. Assim as pectinases produzidas por *A. aculeatus* URM4953 apresentaram grande potencial para aplicações em processos industriais de clarificação de sucos.

Abstract:

In the clarification process of fruit juices, to use pectinase is important to promote the reduction of the viscosity. This reduction provides the minimization of the industrial process costs. Then, this work aimed to clarify the Cajá juice (*Spondias mombin* L.) using the pectinases from *Aspergillus aculeatus* URM4953 by 2² factorial design. The enzymatic extract showed activities of 2.61 U/mL (polygalacturonase), 2.59 U/mL (endo polygalacturonase), 7.02 U/mL (pectin lyase) and 43.5 U/mL (pectin esterase). In the clarification process of cajá juice, the pectinases produced by *A. aculeatus* URM4953 reduced the juice viscosity (89.1%) under the conditions 50°C for 50 minutes. The statistical analysis revealed that except to viscosity reduction, the others physical-chemical characteristics did not display significant effects. Then, the pectinases produced by *A. aculeatus* URM4953 presented great potential to application in industrial process of juice clarification.



**Pedro Renann Lopes de França¹,
Jônatas de Carvalho Silva,
Tatiana Souza Porto**

¹Graduando em engenharia de alimentos, UFRPE, Garanhuns. E-mail: pe-ll@hotmail.com

Contato principal
Pedro Renann Lopes de França¹



Palavras chave: Pectinases, Clarificação, *Aspergillus aculeatus* URM4953.

Keywords: Pectinases, Clarification, *Aspergillus aculeatus* URM4953

