

“

Parâmetros de encapsulação de pectinase comercial em alginato de cálcio e seu efeito na atividade catalítica

▮ Lucia Maria Jaeger de **Carvalho**
UFRJ

▮ Gisela Maria Dellamora **Ortiz**
UFRJ

▮ Flávio de Souza Neves **Cardoso**
UNIRIO

▮ José Luiz Viana de **Carvalho**
CTAA EMBRAPA

▮ Maria Gabriela Bello **Koblitz**
UNIRIO

RESUMO

Introdução: Apesar das propriedades catalíticas elevadas das pectinases, a utilização de enzimas livres sempre apresenta algumas limitações como a baixa estabilidade, dificuldade de recuperação do produto e impossibilidade de uso contínuo. O encapsulamento enzimático é um dos métodos usados para superar essas limitações. Entretanto, é esperado que algum tipo de efeito ocorra em sua atividade catalítica. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi estudar os parâmetros envolvidos no processo de encapsulação de pectinase comercial em alginato de cálcio e o efeito da encapsulação sobre sua atividade catalítica. **Métodos:** Foram avaliados os efeitos dos parâmetros: alginato de sódio, cloreto de cálcio, concentração da enzima e tempo de reação sobre a atividade enzimática e rendimento de encapsulação. O efeito do pH e da temperatura na atividade da enzima livre e encapsulada foi estudado. **Resultados e discussão:** O maior rendimento de imobilização foi obtido a uma concentração de solução enzimática de 4%. As enzimas livres e encapsuladas apresentaram comportamento semelhante quanto à atividade catalítica. A enzima encapsulada apresentava uma faixa de pH mais estreita (pH 4,0) comparada a enzima livre (pH 3,0 a 5,0). Adicionalmente, a enzima encapsulada apresentou aumento de estabilidade na faixa de pH entre 7 e 8 e acima de 10 a 12. **Conclusão:** A encapsulação com alginato de sódio se mostrou eficiente e minimizando custos operacionais para a indústria de alimentos.

Palavras-chave: Pectinase, Encapsulação, Parâmetros, pH, Temperatura.

INTRODUÇÃO

As enzimas pectinolíticas têm muitas aplicações em diferentes indústrias como de frutas e sucos de vegetais, vinho, têxteis e indústrias de papel e celulose (Rehman et al., 2014; Gummadi & Panda, 2003; Kashyap et al., 2001). Pectinase é um termo genérico utilizado para o grupo complexo de enzimas que catalisam a hidrólise da pectina quebrando a ligação α -1-4-glicosídica de ácido galacturônico para diminuir a viscosidade, responsável por causar turvação indesejável em sucos de frutas (Rehman et al., 2013; Kashyap et al., 2001). Apesar de suas propriedades catalíticas elevadas, alguns problemas são encontrados no uso de enzimas em processos industriais como: baixa estabilidade em condições operacionais, sua suscetibilidade às condições do processo, dificuldade de recuperação do produto, impossibilidade de múltiplos reaproveitamentos em um processo industrial e a presença de compostos inibidores, mesmo em baixas concentrações (Lei et al., 2015; Rehman et al., 2013). Vários métodos têm sido propostos para superar essas limitações e, entre elas, se destaca o método de imobilização (Rehman et al., 2013; Mohamad et al., 2015; Krajewska, 2004). As enzimas podem ser imobilizadas por vários métodos que podem ser classificados como físicos, com uma fraca interação entre enzima e suporte e produtos químicos cujas ligações covalentes são formadas com a enzima. Alguns exemplos de métodos físicos são: contenção de uma enzima dentro de um reator de membrana, adsorção (física, iônica) em uma matriz insolúvel em água, inclusão (ou aprisionamento de gel), microencapsulação com uma membrana sólida (Krajewska, 2004). Quando uma enzima é adicionada a um material inerte, algum tipo de efeito espera-se que ocorra na sua atividade catalítica. Estes efeitos podem ser estéricos e/ou conformacionais, podendo interferir com o microambiente difusional e afetar eficiência do sistema catalítico e as características da enzima como pH ideal e temperatura (Mohamad et al., 2015).

OBJETIVO

Estudar os parâmetros envolvidos no processo de encapsulação de uma pectinase comercial em alginato de cálcio e o efeito da encapsulação na sua atividade catalítica.

MÉTODOS

Enzima:

A enzima pectinolítica comercial Pectinex® Ultra Clear (*Aspergillus acutestus*, *Aspergillus niger*) (Novozymes Latin America Ltda) foi usada para os experimentos. Esta enzima foi

selecionada entre outras enzimas comerciais por apresentar um aumento de limpidez mais significativo quando aplicada na polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) como o trabalho preliminar de Cardoso et al. (2014).

Análise da atividade da pectinase

A atividade pectinase das enzimas livres e imobilizadas foi determinada por espectrofotometria a 540 nm usando o método do ácido dinitrosalicílico modificado (Oliveira et al., 2012). Para a reação enzimática, a pectina cítrica foi utilizada como substrato por 30 min. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de amostra necessária para liberar 1 μmol de ácido galacturônico por minuto de reação. As análises foram realizadas em triplicata. A diferença entre as médias foi avaliada por ANOVA seguida do teste de Tukey, sendo consideradas significativas aquelas com $p \leq 0,05$.

Efeitos do pH e da temperatura na pectinase.

O efeito do pH sobre a pectinase foi avaliado a pHs 3,0 a pH 12,0, e os tampões com diferentes pHs foram misturados com a protease purificada na proporção de 1:1. A atividade enzimática foi determinada pelo método de ensaio descrito anteriormente. A mistura de reação foi incubada em diferentes temperaturas que variaram de 30 a 90 °C em pH ótimo, determinado previamente. As análises foram realizadas em triplicata. A diferença entre as médias foi avaliada por ANOVA seguida do teste de Tukey, sendo consideradas significativas aquelas com $p \leq 0,05$.

pH e estabilidade térmica

A pectinase foi pré-incubada a pHs de 3 a 12 a 10 °C por 24h para avaliar sua estabilidade. Após este tempo, a atividade residual de cada tratamento foi determinada pelo método de ensaio descrito anteriormente. A pectinase foi pré-incubada de 30 a 90 °C por 1 h para se avaliar sua estabilidade térmica. Após este tempo, a atividade residual de cada tratamento foi determinada pelo método de ensaio descrito anteriormente. As análises foram realizadas em triplicata. A diferença entre as médias foi avaliada por ANOVA seguida do teste de Tukey, sendo consideradas significativas aquelas com $p \leq 0,05$.

Cápsulas de alginato de cálcio

As cápsulas foram obtidas gotejando-se solução de alginato de sódio a uma solução tampão contendo enzimas em solução de cloreto de cálcio usando bomba peristáltica Cole Parmer - Modelo 7523-80, Masterflex YZ-06475-14 L / S 14, mangueira e agulhas 0,80 x 25

mm. Volumes iguais de alginato de sódio e enzima comercial, diluídos em tampão citrato-fosfato (pH 4,0), foram homogeneizados a 150 rpm por 5 min em homogeneizador Fisatom 713D. Dois mililitros de solução de alginato de sódio e enzima foram gotejados a uma vazão de 2 mL / min em 20 mL de solução de cloreto de cálcio. As cápsulas formadas foram submersas em solução de cloreto de cálcio a 30, 60 ou 90 minutos em um refrigerador a 4 ° C. As cápsulas foram então lavadas em água deionizada e armazenadas em solução tampão de citrato-fosfato pH 4,0. A solução de cloreto de cálcio e a água deionizada utilizadas durante o processo de formação da cápsula foram armazenadas para análise do conteúdo proteico e da atividade da pectinase (Rehman et al., 2013).

Delineamento experimental dos parâmetros utilizados no processo de formação das cápsulas de alginato de cálcio

O planejamento fatorial foi utilizado em 3 níveis de variação com 4 repetições do ponto central com a utilização do software STATISTICA 7.0 para o estudo preliminar dos parâmetros avaliados durante o encapsulamento. Os parâmetros avaliados foram: concentrações de alginato de sódio, cloreto de cálcio e enzima comercial Pectinex Ultra Clear, tempo de reação e concentração da solução enzimática no rendimento de encapsulação e na atividade de pectinase da enzima encapsulada. Os parâmetros e valores usados são mostrados na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1. Parâmetros e valores usados no planejamento fatorial completo para o processo de encapsulação da pectinase.

Parâmetros	-1	0	1
Concentração de alginato de sódio (%)	1	2.5	4
Concentração de cloreto de cálcio (M)	0.05	0.275	0.5
Tempo de reação (min)	30	60	90
Concentração da solução da enzima (% v/v)	0.5	2.75	5

Rendimento de encapsulamento

A quantidade de enzima encapsulada foi determinada pela diferença da quantidade inicial de proteína na enzima comercial diluída usada para a formação das cápsulas pela quantidade de proteína residual presente na solução de cloreto de sódio e a água usada na lavagem das cápsulas. As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Li et al., 2007).

Análise estatística

A análise de variância foi realizada com o software GraphPad Prisma utilizando o teste de Tukey como pós-teste com nível de confiança $p < 0,05$. A metodologia estatística multivariada também foi realizada. Foi utilizado um Planejamento Fatorial Completo (2^n) em 3 níveis de variação com 4 repetições do ponto central utilizando o software STATISTICA 7.0 para os testes exploratórios. (Rodrigues & lemma, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação preliminar dos parâmetros usados no processo de encapsulação, atividade da pectinase e rendimento da encapsulação

Atividade pectinase e rendimento da encapsulação

A avaliação dos parâmetros: concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio, concentração da solução de enzimas e tempo de reação no processo de formação das cápsulas foi realizada para determinar quais deles influenciaram positiva e significativamente a atividade da pectinase e o rendimento da encapsulação. Os parâmetros que afetaram positiva e significativamente foram utilizados na otimização desse processo. Apenas o parâmetro de concentração da enzima foi significativo para o rendimento de encapsulação da resposta no nível de confiança $p \leq 0,05$.

A análise de variância foi significativa para os resultados obtidos com rendimento de encapsulamento ($p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$). O coeficiente de determinação (R^2) apresentou valor de 0,91. Para a resposta da atividade da pectinase, o parâmetro de concentração da enzima foi o único significativo no nível de confiança $p \leq 0,05$. A análise de variância foi significativa para a atividade da pectinase ($p \leq 0,05$). O coeficiente de determinação (R^2) apresentou um valor de 0,94. Portanto, apenas a concentração da enzima afetou significativamente o rendimento do encapsulamento e a atividade da enzima no nível testado ($p \leq 0,05$) e foi considerada para a otimização do encapsulamento.

Outros trabalhos relataram a influência da concentração de alginato de sódio e cloreto de cálcio sobre a atividade da enzima e o rendimento de encapsulamento usando a análise univariada. Rehman et al. (2013) avaliaram a influência do alginato de sódio e concentração de cloreto de cálcio no rendimento de encapsulamento da pectinase do *Bacillus licheniformis* em alginato de cálcio. Os resultados revelaram que tanto a concentração de alginato de sódio quanto a concentração de cloreto de cálcio influenciaram no encapsulamento. Segundo os autores, esse rendimento máximo com 3% da concentração de alginato de sódio é devido à formação de ligações cruzadas que mantiveram as enzimas encapsuladas. Ganaie et al.

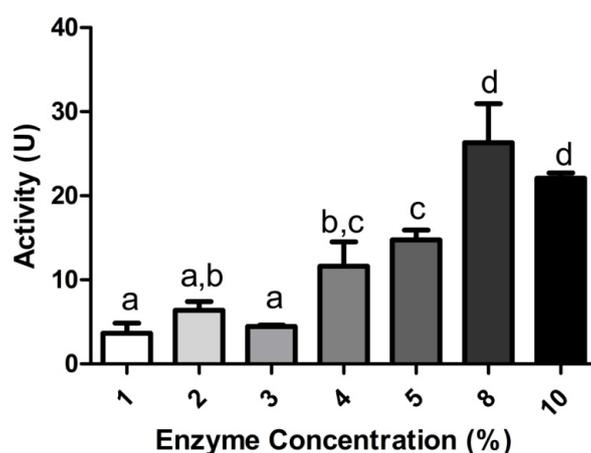
(2014) utilizaram a frutossiltransferase imobilizada em alginato de cálcio para a produção de frutooligossacarídeos. A maior atividade elevada da frutossiltransferase foi alcançada usando uma solução de 3% de alginato de sódio e 1% de cloreto de cálcio. De acordo com os autores, aumentando-se a concentração de alginato acima de 3%, se causaria um aumento na interação entre os sítios ativos da enzima e do alginato, resultando em sua baixa atividade.

Otimização dos parâmetros usados no processo de encapsulamento

Todos os parâmetros foram definidos em seus valores mínimos para o processo de encapsulamento, exceto para a concentração de cloreto de cálcio. O uso dos valores mínimos resultou no uso de menor quantidade de reagente e menor tempo de reação. Soluções de alginato sódio com concentração acima de 2% são muito viscosas tornando-se difícil seu bombeamento. De acordo com Lee et al. (2000), os hidrogéis de alginato podem diminuir até 60% de sua resistência mecânica inicial quando expostos por mais de 15 horas em soluções tampão fisiológicas, o que foi atribuído à perda de íons divalentes pela troca com íons monovalentes presentes na solução. Portanto, foram utilizados para otimização, solução de alginato de sódio a 1%, solução de cloreto de cálcio 0,5 M e tempo de reação de 30 min. Para a otimização do processo de formação das cápsulas, concentrações de enzima variando de 1 a 10% foram utilizadas.

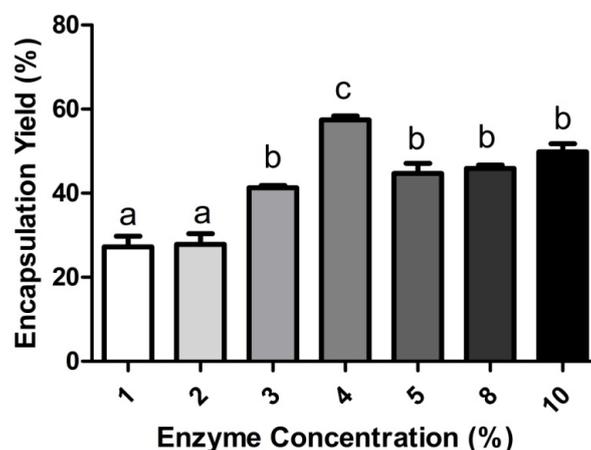
Quanto maior for a concentração de enzima utilizada no processo de encapsulamento, maior foi a atividade apresentada pela enzima encapsulada (Figura 1A). O aumento da atividade é, possivelmente, devido ao acúmulo de enzima na superfície e nos poros da cápsula de alginato de cálcio. Aumentando-se a concentração de enzima na formação de cápsulas de alginato de cálcio resultou em encapsulamento aumentando o rendimento na concentração de 4% (Figura 1B). A partir deste valor, ocorreu diminuição no rendimento ($p \leq 0,05$) devido ao fato de que maiores concentrações levariam a uma maior perda de enzimas para o cloreto de cálcio solução durante o gotejamento. Busto et al. (2006) imobilizaram pectinases comerciais em cápsulas de alginato de cálcio por adsorção. Os maiores rendimentos de imobilização foram obtidos quando 1,2% da enzima foi utilizada. De acordo com os autores, em concentrações mais elevadas, existe uma competição das enzimas pelo mesmos sítios de ligação. Comparando-se as duas variáveis dependentes analisadas (pectinase atividade e rendimento de encapsulamento), a concentração de 4% foi considerada ideal para a enzima comercial no processo de formação das cápsulas.

Figura 1. Atividade da enzima Pectinex® Ultra Clear. Uma unidade de atividade corresponde a formação de 1 µg de ácido galacturônico / min de reação. Letras iguais não diferem significativamente entre si a um nível de confiança de $p < 0.05$.



O aumento da concentração da enzima na formação das cápsulas de alginato de cálcio resultou em aumento do rendimento de encapsulação para a concentração de 4% (Figura 1B). A partir desse valor, ocorreu uma diminuição no rendimento ($p \leq 0,05$) porque as concentrações levariam a uma maior perda de enzimas para a solução de cloreto de cálcio durante o gotejamento.

Figura 1. Rendimento da enzima Pectinex® Ultra Clear encapsulada em alginato de cálcio em diferentes concentrações de enzima durante sua preparação. Uma unidade de atividade representa a formação de 1 µg de ácido poligaracturônico/ minuto de reação. Letras iguais não diferem significativamente entre si a um nível de confiança de $p < 0.05$.

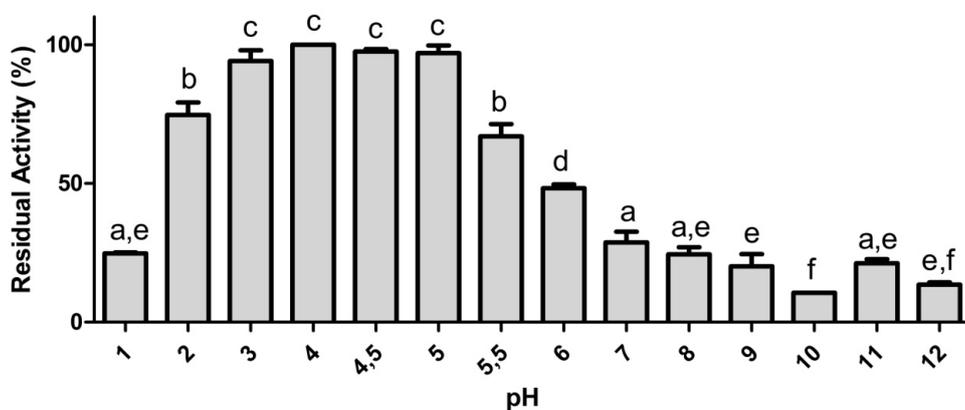


Busto et al. (2006) imobilizaram pectinases comerciais em cápsulas de alginato de cálcio por adsorção. Os maiores rendimentos de imobilização foram obtidos quando 1,2% da enzima foi utilizada. Segundo os autores, em concentrações mais elevadas, há competição das enzimas pelos mesmos sítios de ligação. Comparando as duas variáveis dependentes analisadas (atividade da pectinase e rendimento de encapsulamento), a concentração de 4% foi considerada ótima para a enzima comercial no processo de formação das cápsulas.

Efeito do pH e da temperatura na atividade da enzima comercial Pectinex Ultra Clear livre

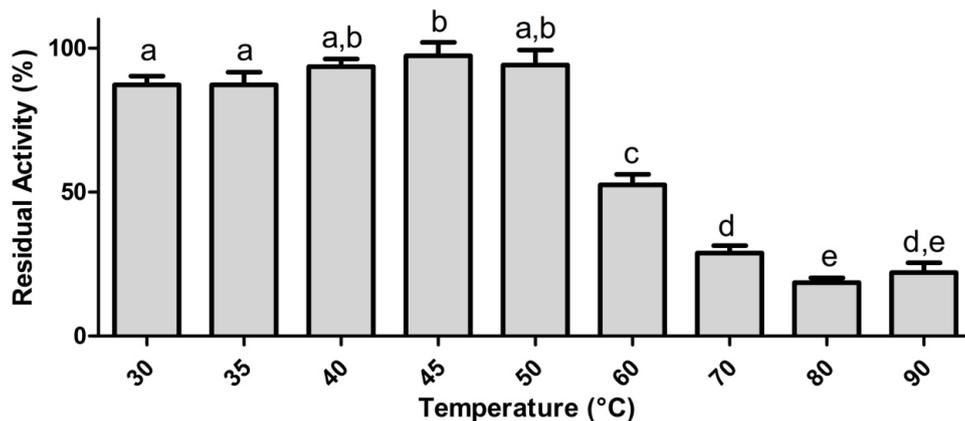
A enzima comercial Pectinex Ultra Clear livre mostrou um pH ótimo de atividade entre 3 e 5 (Figura 2A). A atividade de pectinase, entre esses valores, não foi significativamente diferente no nível de confiança $p \leq 0,05$. A enzima comercial Pectinex Ultra Clear livre mostrou uma faixa de temperatura de atividade ideal entre 40 e 50 ° C (Figura 2B). Durante as análises subsequentes de atividade, a temperatura foi de 40 ° C. Quanto mais baixa for a temperatura, menor a alteração dos componentes do meio, como vitaminas, pigmentos e compostos aromáticos.

Figura 2. Efeito do pH na atividade da enzima livre Pectinex Ultra Clear. Letras iguais não diferem significativamente entre si no nível de confiança $p < 0,05$.



Ahmed et al. (2016) purificando a pectinase de *Aspegillus niger* obteve pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 50 ° C de atividade enzimática. Poligalacturonase purificada de *Penicillium veridicatum* apresentou um pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 55 ° C (Silva et al., 2002).

Figura 2. Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima livre Pectinex Ultra Clear. Letras iguais não diferem significativamente entre si no nível de confiança $p < 0,05$. pH e estabilidade térmica da enzima comercial Pectinex Ultra Clear



A enzima Pectinex Ultra Clear comercial livre teve estabilidade de pH entre 2 e 6 e entre 9 e 10 (Figura 3A). Amostras de enzimas encapsuladas e livres foram armazenadas em tampão citrato-fosfato pH 4,0. As duas faixas distintas de estabilidade de pH observadas na Figura 3A podem indicar a presença de isoenzimas na pectinase comercial. A enzima comercial Pectinex Ultra Clear livre teve estabilidade térmica entre 30 e 45 ° C após 1 h de incubação (Figura 3B). Pectinases de *Penicillium viridicatum* RFC3 produzidas por processo fermentativo em estado sólido (Silva et al., 2002) mostraram estabilidade em pHs entre 5,0 e 8,0 e nas temperaturas entre 30 e 40 ° C para a atividade da poligalacturonase.

Figura 3. Estabilidade de pH da enzima comercial Pectinex® Ultra Clear livre. Letras iguais não diferem significativamente umas das outras no nível de confiança $p < 0,05$.

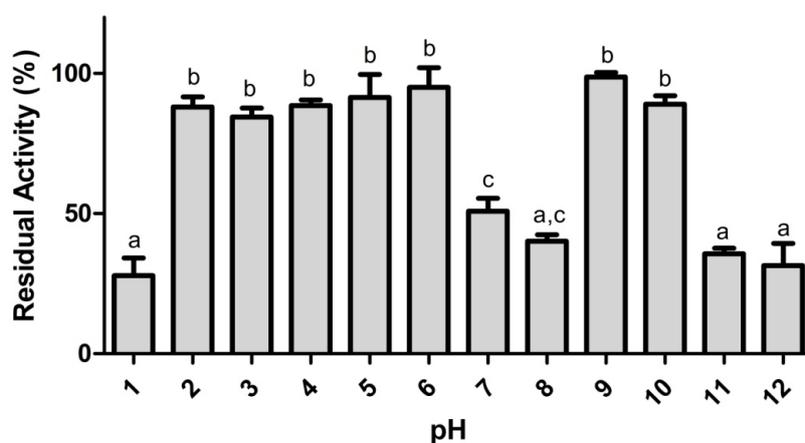
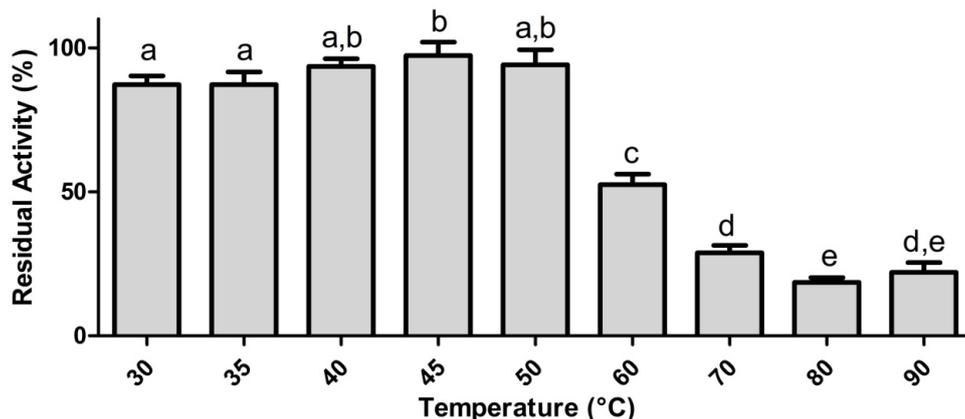


Figura 3. Estabilidade térmica da enzima comercial Pectinex® Ultra Clear livre. Letras iguais não diferem significativamente umas das outras no nível de confiança $p < 0,05$.

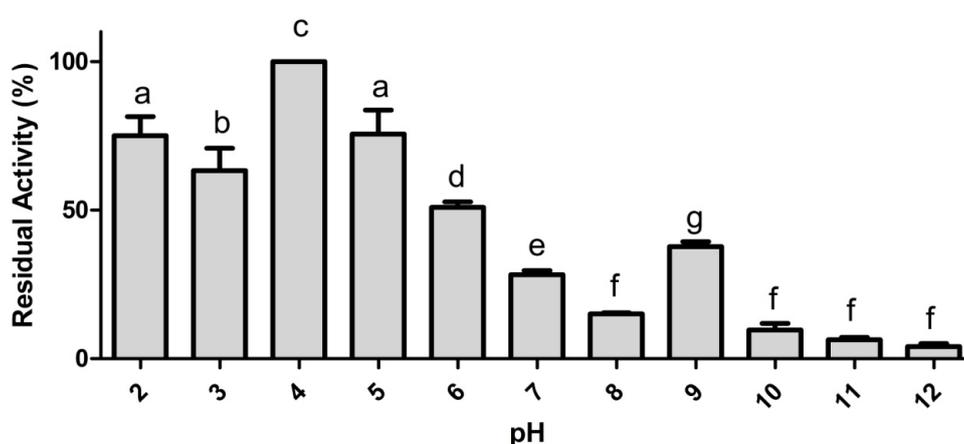


Efeito da temperatura e do pH na atividade da enzima Pectinex Ultra Clear encapsulada

Após a definição dos parâmetros utilizados no processo de encapsulação da enzima, foi realizada uma caracterização do pH e da temperatura ótima e estabilidade para comparação com os resultados obtidos com a enzima livre.

Após o encapsulamento, a enzima mostrou estreitamento na faixa de atividade de pH ideal. A enzima encapsulada apresentou maior atividade em pH 4,0 (Figura 4A) enquanto o a enzima livre variou de 3,0 a 5,0 (Figura 2A). É possível que a proximidade da enzima à superfície carregada negativamente do alginato tenha causado uma mudança na ionização do sítio ativo da enzima e/ou na conformação do substrato, fazendo uma adaptação enzima-substrato altamente eficiente apenas em pH 4,0 (Garg & Kumar, 2008). De forma geral, tanto a enzima livre quanto a encapsulada mostraram padrões semelhantes. Ambas as enzimas apresentaram uma redução acentuada da atividade em pH 6,0.

Figura 4. Efeito do pH sobre a atividade da enzima Pectinex® Ultra Clear encapsulada. Letras iguais não deferem, significativamente, ao nível de confiança de $p < 0.05$.



Outros autores não observaram diferença entre os pHs ideais da enzima livre e encapsulada. Anwar et al. (2009), imobilizando protease de *Bacillus subtilis* KOBGE-SAH em alginato de cálcio, observaram que não havia diferença entre o pH ótimo (pH 7,5) das enzimas livres e encapsuladas. De acordo com Rehman et al. (2013), a imobilização da pectinase de *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 em alginato de cálcio, não alterou o pH ideal da enzima, que era igual a 10,0. Segundo os autores, a enzima livre foi mais afetada pela mudança de pH em valores abaixo de 7,0 devido a maior estabilidade conformacional alcançada pela enzima imobilizada dentro da rede do polímero de alginato de cálcio.

Tal como aconteceu com a Pectinex Ultra Clear livre, a enzima encapsulada teve a maior atividade entre 40 e 50 ° C (Figura 4B). A partir de 70 ° C, tanto a enzima livre quanto a encapsulada apresentaram redução significativa ($p \leq 0,05$) de suas atividades. Outros autores também não encontraram qualquer diferença entre a temperatura ótima da enzima livre e daquela encapsulada. Busto et al. (2006) não observaram diferença entre a temperatura ótima de 55 ° C ao usar a pectinase Rapidase C80 livre e encapsulada em alginato de cálcio, relatando que a enzima livre manteve 80% de sua atividade máxima em uma faixa de temperatura (37-80 ° C) superior a encapsulada (45-70° C). Arya & Srivastava (2006) reportaram que após a imobilização de CGTase (ciclodextrina gliconotransferase) produzida

por *Bacillus macerans* ATCC 8244, em alginato de cálcio, não houve qualquer variação da temperatura ótima de atividade em relação a enzima livre que era 60 ° C. Os autores também relataram que o padrão de enzima imobilizada com a variação de temperatura foi muito semelhante à enzima livre, como ocorreu no presente trabalho.

No entanto, Rehman et al. (2013) observaram variação da temperatura ótima de atividade após a imobilização de pectinase de *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21, em cálcio alginato de 45 ° C, apresentado pela enzima livre, a 55 ° C. O aumento de temperatura ideal para a enzima encapsulada pode ser devido à limitação física da enzima que causou um aumento na energia de ativação necessária para o substrato se ligar ao sítio ativo da enzima imobilizada. **pH e estabilidade térmica de Pectinex Ultra Clear encapsulada**

A enzima Pectinex Ultra Clear encapsulada apresentou maior estabilidade em pH 3,0 (Figura 5A). A enzima livre tinha um pH de estabilidade entre 2 e 6 e, entre 9 e 10 (Figura 3A). A enzima encapsulada manteve 70% de sua atividade máxima na faixa de pH estudada (2 a 12), diferentemente da enzima livre, apresentando maior estabilidade de pH após a imobilização.

A Pectinex Ultra Clear encapsulada apresentou maior estabilidade térmica a 40 ° C (Figura 5B) enquanto a enzima livre mostrou faixa de temperatura entre 30 e 40 ° C (Figura 3B). A enzima encapsulada manteve 55,8% de sua atividade máxima a 50 ° C enquanto a enzima livre 41,1%. A partir de 60 ° C, as duas formas tiveram uma redução drástica em sua atividade (abaixo de 20%).

Figura 4. Efeito da temperatura sobre a atividade da enzima Pectinex® Ultra Clear encapsulada. Letras iguais não diferem significativamente ao nível de confiança de $p < 0.05$.

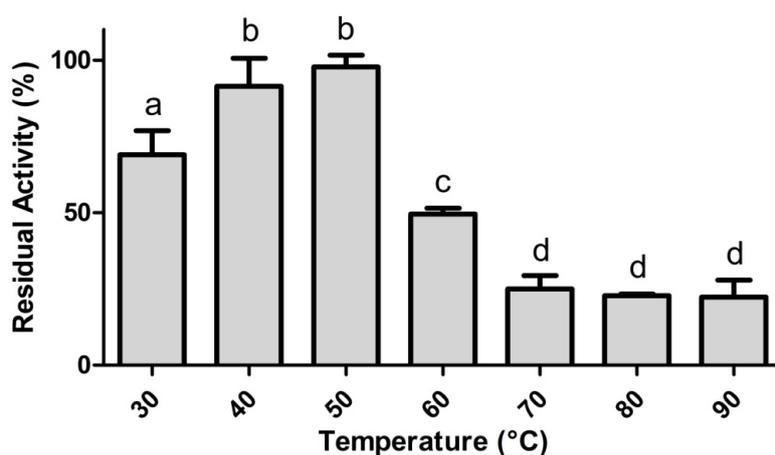
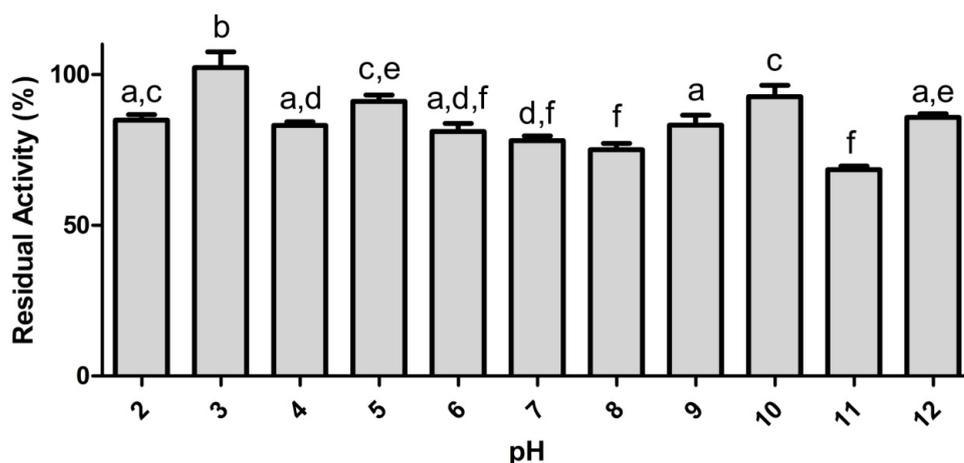
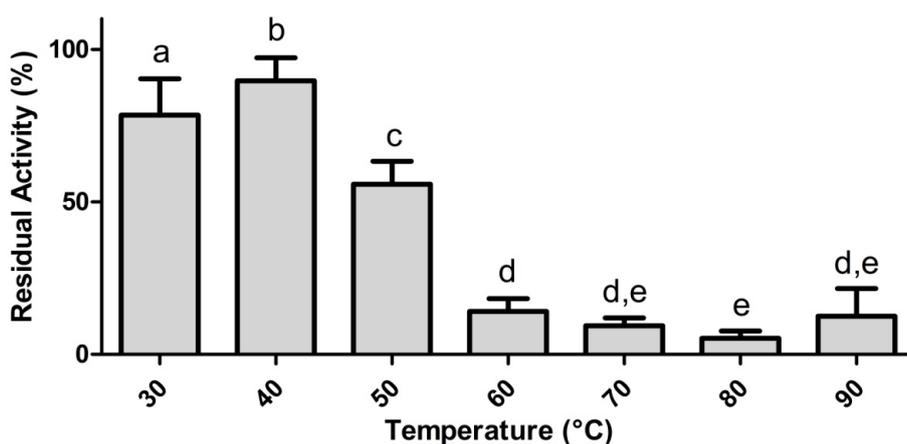


Figura 5. Efeito do pH na estabilidade da enzima Pectinex® Ultra Clear encapsulada. Letras iguais não diferem significativamente umas das outras no nível de confiança $p < 0,05$.



Com os resultados obtidos pode-se afirmar que o encapsulamento não aumentou a estabilidade da enzima de acordo com o aumento da temperatura. Ramirez et al. (2013) reportaram aumento da estabilidade térmica de Pectinase de *Aspergillus niger* após encapsulamento por adsorção em alginato de cálcio e quitina. Verificaram que as enzimas, livre e encapsulada mantiveram sua atividade máxima até 40 ° C e 50 ° C, respectivamente. A enzima livre, foi inativada a 60 ° C, enquanto a enzima encapsulada ainda manteve 25% de sua atividade.

Figura 5. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima Pectinex® Ultra Clear encapsulada. Letras iguais não diferem significativamente umas das outras no nível de confiança $p < 0,05$.



CONCLUSÃO

A imobilização da enzima Pectinex Ultra Clear, por encapsulamento em alginato de cálcio, foi eficiente. Na otimização do encapsulamento, a única variável significativa foi a concentração enzimática. O melhor rendimento de imobilização foi obtido com uma solução

enzimática de 4%. As outras condições para imobilização da enzima foram concentração de 2% de alginato de sódio, cloreto de cálcio de 0,5M e tempo de reação de 30 min. As características da enzima encapsulada foram semelhantes às da enzima livre, apresentando apenas diferenças em relação ao estreitamento ideal da faixa de pH (4) e aumento da estabilidade nas faixas de pH entre 7 e 8 e acima de 10 a 12.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos mostraram-se promissores e aplicáveis para a hidrólise enzimática em diferentes tipos de alimentos, principalmente, em indústrias de polpas e sucos de frutas.

■ REFERÊNCIAS

1. Ahmed, I., Zia, M. A., Hussain, M. A., Akram, Z., Naveed, M. T., & Nowrouzi, A. (2016). Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(2), 148-154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jrras.2015.11.003>.<https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.11.003>
2. Anwar, A., Qader, S. A. U., Raiz, A., Iqbal, S., & Azhar, A. (2009). Calcium alginate: a support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. *World Applied Sciences Journal*, 7(10), 1281-1286.
3. Arya, S. K., & Srivastava, S. K. (2006). Kinetics of immobilized cyclodextrin gluconotransferase produced by *Bacillus macerans* ATCC 8244. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(3), 507-510. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.12.019>.
4. Busto, M. D., García-Tramontín, K. E., Ortega, N., & Perez-Mateos, M. (2006). Preparation and properties of an immobilized pectinlyase for the treatment of fruit juices. *Bioresource Technology*, 97(13), 1477-1483. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.06.013>. PMID:16102964.
5. Cardoso, F. S. N., Koblitz, M. G. B., Ramos, M. F. S., Dellamora Ortiz, G. M., & Carvalho, L. M. J. (2014). Avaliação preliminar do uso de enzimas comerciais na clarificação de polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.). In CIBIA9 Congresso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos: Vol. 1 (pp. 246-254). Valencia: Editorial Universitat Politècnica de València, Espanha.
6. Ganaie, M. A., Rawat, H. K., Wani, O. A., Gupta, U. S., & Kango, N. (2014). Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides. *Process Biochemistry*, 49(5), 840-844. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.026>.
7. Garg, N., & Kumar, A. (2008). Immobilization of starch phosphorylase from cabbage leaves: production of glucose-1-phosphate. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25(2), 229-235. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66322008000200002>.
8. Gummadi, S. N., & Panda, T. (2003). Purification and biochemical properties of microbial pectinases—a review. *Process Biochemistry* (Barking, London, England), 38(7), 987-996. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00203-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00203-0).

9. Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77(3), 215-227. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00118-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00118-8). PMID:11272008.
10. Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), 126-139. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.013>.
11. Lee, K. Y., Rowley, J. A., Eiselt, P., Moy, E. M., Bouhadir, K. H., & Mooney, D. J. (2000). Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and crosslinking density. *Macromolecules*, 33(11), 4291-4294. <http://dx.doi.org/10.1021/ma9921347>.
12. Lei, M., Hu, D., Yang, H., & Lei, Z. (2015). Preparation and characterization of hollow magnetic composite nanoparticles for immobilized pectinase. *Surface and Coatings Technology*, 271, 2-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surfcoat.2015.02.018>.
13. Li, T., Wang, N., Li, S., Zhao, Q., Guo, M., & Zhang, C. (2007). Optimization of covalent immobilization of pectinase on sodium alginate support. *Biotechnology Letters*, 29(9), 1413-1416. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-007-9409-3>. PMID:17541760.
14. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 205-220. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>. PMID: 26019635.
15. Oliveira, R. Q., Valasques, G. L. Jr., Uetanabaro, A. P. T., Koblitz, M.G. B., Góes-Neto, A., Rosa, C. A., & Assis, S. A. (2012). Influence of carbon source, pH, and temperature on the polygalacturonase activity of *Kluyveromyces marxianus* CCMB 322. *Food Science and Technology (Campinas)*, 32(3), 499-504. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612012005000087>.
16. Ramirez, H., Briones, A. I., Úbeda, J., & Arevalo, M. (2013). Immobilization of pectinase by adsorption on an alginate-coated chitin support. *Biotecnología Aplicada*, 30(2), 101-104.
17. Rehman, H. U., Aman, A., Silipo, A., Qader, S. A., Molinaro, A., & Ansari, A. (2013). Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. *Food Chemistry*, 139(1-4), 1081-1086. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.069>. PMID:23561212.
18. Rehman, H. U., Nawaz, M. A., Aman, A., Baloch, A. H., & Qader, S. A. U. (2014). Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 on chitosan beads for continuous degradation of pectin polymers. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 282-287. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.09.003>.
19. Rodrigues, M. R., & Iemma, A. F. (2005). Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamento. Campinas: Casa do Pão Editora.
20. Silva, D., Martins, E. S., Silva, R., & Gomes, E. (2002). Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(4), 318-324. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822002000400008>.