

# TERMODINÂMICA E CINÉTICA DAPOLIGALACTURONASE DE *Aspergillus japonicus* URM5620

J. C. SILVA, J. G. W. SIQUEIRA e T. S. PORTO

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Garanhuns,  
UFRPE/UAG.

Foram investigadas a termodinâmica e a cinética da poligalacturonase (PG) produzida por *Aspergillus japonicus* URM5620. A temperatura ótima da PG foi 50°C, com estabilidade a 30°C após 80 min de incubação. A cinética apresentou energia de ativação (9,66 kJ.mol<sup>-1</sup>) e desativação (38,9 kJ.mol<sup>-1</sup>). Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram 9,6 mg.mL<sup>-1</sup> e 2,3 μmol.mL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, respectivamente. O coeficiente de temperatura médio de ativação  $Q_{10atv}$  foi de 1,31 (30 a 50°C) e de desativação  $Q_{10in}$  1,47 (60 a 80°C). Nas temperaturas de 30 a 50°C os valores de D e t<sub>1/2</sub> ficaram acima de 200 min e 80 min. O valor z foi de 52,35°C. Os parâmetros termodinâmicos da PG foram  $\Delta G^\circ$  de 102,40 kJ.mol<sup>-1</sup> a 50°C,  $\Delta H^\circ$  de 36,27 kJ.mol<sup>-1</sup> e  $\Delta S^\circ$  -204,72 J.mol<sup>-1</sup>.k<sup>-1</sup>. A partir desses dados pode se observar que a PG de *Aspergillus japonicus* URM5620 apresentou boa estabilidade quanto a mudanças de temperaturas e baixa energia de ativação, diminuindo os custos de produção, sendo, portanto uma boa alternativa para futuras aplicações industriais.

Palavras-chave: pectinase, *Aspergillus japonicus*, termodinâmica e cinética.

## 1. INTRODUÇÃO

As pectinases são um grupo de enzimas responsáveis pela catálise da degradação de moléculas complexas denominadas substâncias pécicas, que são polissacarídeos estruturais da parede primária das células vegetais jovens e principais componentes da lamela média, através da reação de despolimerização (hidrolases e liases) e desesterificação (esterases) (Pedrollet *et al.*, 2009). Nas indústrias de alimentos, as pectinases são extensivamente usadas para a extração e clarificação de sucos de frutas, principalmente as produzidas por fungos, que são utilizadas em muitos processos industriais em larga escala (Palanivelu, 2006).

De acordo com seu modo de ação, as pectinases podem ser classificadas em despolimerizantes e desmetoxilantes (Koblitz, 2008). Dentre as despolimerizantes, as poligalacturonases (PGs) são as que apresentam maior interesse comercial, por possuírem a principal e maior função hidrolítica (Santos *et al.*, 2008). Estas compõem o maior grupo de enzimas responsáveis pela despolimerização da pectina/ácidos pécicos por clivagem das ligações glicosídicas em reações de hidrólise (Palanivelu, 2006).

PGs isoladas a partir de diferentes fontes microbianas diferem nitidamente umas das outras no que diz respeito à suas propriedades físico-químicas, biológicas e seu modo de ação (Jayaniet *et al.*, 2005).

De acordo com Souza *et al.* (2010), para manter o nível desejado de atividade enzimática por um longo período de tempo, na aplicação industrial, é essencial conhecer

particularidades e informações relevantes sobre a enzima, como os parâmetros bioquímicos, termodinâmicos e cinéticos, obtidos pela caracterização enzimática. Assim, a correta compreensão do significado desses parâmetros aliada à manipulação matemática, permite prever o comportamento da enzima para condições não realizadas experimentalmente, ou seja, a partir dos dados experimentais, é possível estimar resultados em sistemas reais não estudados (EL-LOLY; AWAD; MANSOUR, 2007).

Na literatura, poucos dados são encontrados sobre os parâmetros termodinâmicos e cinéticos de poligalacturonases do gênero *Aspergillus*, especialmente quando oriunda de *Aspergillus japonicus*. Deste modo, este trabalho teve como objetivo estudar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da poligalacturonase produzida por *Aspergillus japonicus* URM5620.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Micro-organismo

Foi utilizado o *Aspergillus japonicus* URM5620, adquirido da coleção de culturas URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco– UFPE, selecionado por ausência de micotoxinas, ocratoxina A e aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2).

### 2.2. Tratamento do substrato

O substrato utilizado para fermentação em estado sólido foi casca do maracujá obtida na estação Experimental de Brejão do IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco), Brejão-PE. Foi submetido a lavagem, sanitização por imersão em solução de hipoclorito de sódio 2% (por uma hora), enxágue com água corrente e água destilada, descascamento manual, trituração, secagem em estufa com circulação de ar a 65°C até completa desidratação, e separação granulométrica em peneiras de aço com granulometria entre 0,5 a 2 mm, sendo então armazenadas, separadamente, em recipientes fechados a temperatura ambiente.

### 2.3. Preparo do inóculo

A linhagem de *Aspergillus japonicus* URM5620 foi inoculada em Erlenmeyer de 125 mL contendo meio de cultura Czapek e Ágar 1,5%, durante 7 dias a 30°C até ocorrer a esporulação. Os esporos foram coletados com a adição de 5 a 10 mL de uma solução esterilizada de NaCl 0,9% (p/v) e Tween 80 (0,01% v/v). A contagem foi realizada em microscópio, em câmara de Neubauer, de modo que fosse obtida uma concentração final de  $10^7$  esporos/mL.

### 2.4. Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação foi realizada em Erlenmeyers de 125 mL contendo 7 g do substrato, autoclavado a 121°C durante 20 minutos, a solução nutritiva (extrato de levedura 0,5% e dextrose 1% em tampão citrato de sódio 0,1M e pH 5,5) e a solução de esporos com concentração de  $10^7$  esporos/mL, estas foram adicionadas para que a fermentação

apresentasse uma umidade de 30%. Os substratos inoculados foram incubados em estufa a 30°C durante 96 horas.

## 2.5. Extração da enzima

A extração da enzima foi realizada a partir da maceração do substrato fermentado, com a adição de 30 mL de tampão acetato pH 4,5 seguido de filtração em peneiras contendo gaze para retirada do substrato e obtenção do extrato bruto. Os extratos foram centrifugados a 1000 rpm durante 20 minutos para a decantação das células e retirada do sobrenadante, que foram então armazenados a -20°C.

## 2.7. Atividade de poligalacturonase - PG

A atividade da poligalacturonase (PG) foi determinada pelo método de Miller (1959), misturando-se 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de pectina cítrica 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  em tampão acetato 0,1 M pH 4,5 e incubando a 40°C por 15 minutos, para estabilização de temperatura. Em seguida adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático, incubando a 40°C por 40 minutos em banho-maria. Foi retirado uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  e adicionada a 1 mL de solução de ácido dinitrossalicílico. A mistura foi mantida em ebulição por 5 minutos para formação de cor e resfriada em banho de gelo. Foram adicionados 5,0 mL de água destilada e a amostra foi homogeneizada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm contra o branco, os dados plotados na mesma curva padrão estabelecida com ácido  $\alpha$ -D-galacturônico para açúcar redutor.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de ácido galacturônico por minuto ( $U = \mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$ ).

## 2.8. Determinação dos parâmetros termodinâmicos e cinéticos

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi avaliado incubando-se a mistura de reação em temperaturas de 30°C a 80°C, com intervalo de 10°C. A estabilidade à temperatura foi avaliada mantendo-se o extrato enzimático na ausência de substrato em temperaturas de 30°C a 80°C, onde foram retiradas alíquotas para determinação da atividade nos tempos 0, 20, 40, 60 e 80 minutos e em seguida realizadas as atividades enzimáticas da PG, conforme descrito anteriormente. Os parâmetros termodinâmicos foram estimados através dos dados obtidos nos ensaios de efeito da temperatura sobre a atividade enzimática e da estabilidade da enzima frente a temperatura.

Os testes para a determinação dos parâmetros cinéticos da PG foram realizados usando diferentes concentrações ( $S_0$ ) de pectina ( $2 < S_0 < 18 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Velocidade máxima ( $V_{\text{max}}$ ) e constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ): As características da cinética enzimática da poligalacturonase ( $K_m$  e  $V_{\text{max}}$ ) foram determinadas conforme o método gráfico de LineweaverBurk citado por Brune (1978) e Porto *et al.* (2006).

Energia de Ativação ( $E_a$ ): Foi estimada a partir dos dados obtidos no estudo da influência da temperatura na atividade, plotando-se um gráfico  $\ln k$  em função do inverso da temperatura, conforme a forma linearizada da equação de Arrhenius.

Energia de Inativação Térmica ( $E_d$ ):Primeiramente, determinou-se as constantes de inativação térmica  $k_d$  plotando-se um gráfico  $\ln A$  (atividade enzimática) versus tempo. Os coeficientes angulares de cada curva foram as constantes de inativação ( $k_d$ ). Após a determinação das constantes de inativação, a energia de inativação ( $E_d$ ) foi estimada plotando-se um gráfico  $\ln (k_d)$  versus  $1/T$  (Temperatura) conforme a equação linearizada de Arrhenius.

Coefficiente de temperatura ( $Q_{10}$ ):Denota o quanto mais rápido uma reação ocorre quando a temperatura é elevada de  $10^\circ\text{C}$ . O  $Q_{10}$ , para aumento da velocidade de ativação da reação foi determinado conforme proposta por Riazet *al.* (2007) e Maisuriaet *al.* (2010) na faixa de temperatura de  $30$  a  $50^\circ\text{C}$ . O  $Q_{10}$  de inativação enzimática foi calculado como o valor médio para os valores de  $Q_{10}$  nos intervalos de temperatura de  $60^\circ\text{C}$  a  $70^\circ\text{C}$  e de  $70^\circ\text{C}$  a  $80^\circ\text{C}$ .

Tempo de meia vida da PG ( $t_{1/2}$ ): foi calculado conforme Lavorentiet *al.* (2003)

Tempo de redução decimal (valor D):Foi calculado conforme Lavorentiet *al.* (2003) e o valor  $Z$  que é a diferença de temperatura requerida para reduzir o valor de D em 90% foi obtida pelo inverso do coeficiente angular da reta construída a partir de  $\log (D)$  versus temperatura ( $^\circ\text{C}$ ).

Parâmetros termodinâmicos de desnaturação:Os valores de  $\Delta H^*$  e  $\Delta S^*$  foram obtidos utilizando-se o gráfico semi-logarítmico de Eyring pela inclinação e interceptação de  $\ln k$  versus  $1/T$ , respectivamente e calculados de acordo com Petersson (2000), Porto *et al.* (2006) e Heidtmann *et al.* (2012):

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da PG

Os dados mostraram que a PG apresentou temperatura ótima de ação em  $50^\circ\text{C}$ . Após essa temperatura a enzima começou a perder sua atividade. Entretanto, há outra variável que deve ser levada em consideração ao avaliar a atividade enzimática, que é o tempo de exposição a uma determinada temperatura, pois o fato da PG ter apresentado maior atividade a  $50^\circ\text{C}$  não significa que esta irá manter tal atividade por todo o tempo de incubação. Assim, com a realização dos ensaios para conhecer a estabilidade da PG frente a temperatura observou-se que a pectinase foi estável apenas a  $30^\circ\text{C}$  por 80 min mantendo mais de 70% de sua atividade inicial.

Outros autores obtiveram um resultado similar ao desse trabalho. Souza *et al.* (2010) relataram uma temperatura ótima de  $50^\circ\text{C}$  para a PG de *Aspergillus niger*, Maciel *et al.* (2011)  $40^\circ\text{C}$  para a PG de *Aspergillus niger* URM4645, Soares *et al.* (1999) uma temperatura de  $50^\circ\text{C}$  para a PG do *Bacillus* P4-3 e Chellegattiet *al.* (2002) encontraram uma atividade máxima para a PG de *Penicillium frequentans* a  $50^\circ\text{C}$ .

#### 3.2. Energia de Ativação ( $E_a$ ) e coeficiente de ativação ( $Q_{10atv}$ )

A energia mínima para ativação da reação para transformação da pectina em unidades de ácidos galacturônicos foi de  $9,66 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Para a utilização de enzimas em processos industriais torna-se desejável que estas possuam baixas energias de iniciação da reação, pois

este fato acarretará menores custos de produção. A PG produzida por *A. japonicus* URM5620 apresentou baixa energia de ativação em comparação a alguns preparados pectinolíticos comerciais como Rapidase C80 e Pectinase CCM com valores de 26,5 e 45,6 kJ.mol<sup>-1</sup>, respectivamente (Ortega *et al.*, 2004).

O  $Q_{10atv}$  médio calculado na faixa de temperatura de 30 a 50°C, faixa de crescimento da atividade da PG, foi de 1,31. Esse valor expressa o aumento da taxa da velocidade de reação devido a um aumento da temperatura de 10°C. Esse resultado se encontra próximo aos obtidos por Maisuria *et al.* (2010) e Riaz *et al.* (2007) que obtiveram valores de 1,03 e 1,01, respectivamente.

### 3.3. Constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e velocidade máxima ( $V_{max}$ )

Os valores encontrados para  $K_m$  e  $V_{max}$  foram 9,6 mg/mL e 2,3  $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , respectivamente. Observou-se que, o aumento da concentração de pectina fez com que fosse reduzida a velocidade da reação em função do incremento do teor de carboidratos no meio. Esse comportamento corrobora com o encontrado por Deuner *et al.* (2005).

### 3.4. Energia desativação térmica ( $E_d$ )

Com os valores de  $K_d$  obtidos anteriormente estimou-se a energia de desativação  $E_d$  plotando-se um gráfico  $\ln(K_d)$  versus  $1/\text{temperatura}$ . A energia mínima necessária para a iniciação de desnaturação/inativação da poligalacturonase de *Aspergillus japonicus* URM5620 foi de 38,9 kJ.mol<sup>-1</sup>. Esse resultado difere do encontrado por Dogan *et al.* (2007), que em sua pesquisa sobre a PG de *Aspergillus sojae* obtiveram um resultado de  $E_d$  do estrato bruto e purificado de 151,81 e 285,97 kJ.mol<sup>-1</sup>, respectivamente.

### 3.5. Parâmetros cinéticos de inativação $D$ , $Z$ , $Q_{10in}$ e $t_{1/2}$

Os tempos de meia vida da PG para cada temperatura estão demonstrados na Tabela 1. Ao ser observada a temperatura ótima de atuação da PG, 50°C, pode-se notar que a atividade enzimática manteve-se estável mais de uma hora até atingir 50% da sua atividade inicial.

Tabela 1: Parâmetros cinéticos obtidos para o processo de inativação da poligalacturonase

Temperatura (°C)	$K_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{(1/2)}$ (min)	Valor D (min)	$Q_{10in}$	Valor z (°C)
30	0,0043	161,19	535,58	---	---
40	0,0077	90,02	299,09	---	---
50	0,0086	80,59	267,79	---	---
60	0,0214	32,39	107,61		
70	0,0248	27,95	92,86	1,47	52,35
80	0,0383	18,09	60,13		

A partir da análise dos dados presentes na Tabela 1 verificou-se que a PG apresentou altos valores para D, ficando acima de 200 min na faixa de temperatura entre 30 a 50°C e Z com 52,35°C. O valor do coeficiente de inativação térmica  $Q_{10in}$  médio calculado na faixa de temperatura de 60 a 80°C, está representado na Tabela 1. Esse valor expressa o aumento da taxa de decrescimento da velocidade de reação devido a um aumento da temperatura de 10°C. Segundo Fontanet *al.* (2012) valores de  $Q_{10in}$  pequenos demonstram que a cinética de inativação enzimática foi fracamente afetada pelo aumento da temperatura.

### 3.6. Parâmetros termodinâmicos

A Tabela 2 mostra os valores experimentais da termodinâmica da PG obtidos na faixa de temperatura de 30 a 50°C.

 Tabela 2: Valores experimentais da energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ), entalpia ( $\Delta H^\circ$ ) e entropia ( $\Delta S^\circ$ ) para a poligalacturonase produzida por *Aspergillus japonicus* URM5620

Temperatura (°C)	$\Delta G^\circ$ ( $\text{KJ.mol}^{-1}$ )	$\Delta H^\circ$ ( $\text{KJ.mol}^{-1}$ )	$\Delta S^\circ$ ( $\text{J.mol}^{-1}.\text{k}^{-1}$ )
30	98,30	36,27	-204,72
40	100,35		
50	102,40		

De acordo com os dados da Tabela 2, nota-se que o  $\Delta G^\circ$  aumentou com a temperatura. Este comportamento pode ser explicado avaliando-se o valor de  $\Delta S^\circ$ , que foi alto e negativo. Segundo Porto *et al.* (2006), esse fenômeno condiz com a formação de um estado de transição, ou seja, enzima-substrato, que forma uma estrutura mais rígida. Naidu e Panda (2003) também explicam que a possível razão para a entropia negativa foi a compactação da molécula de enzima e tal mudança pode surgir a partir da formação de partículas carregadas em torno da molécula de enzima e o ordenamento das moléculas de solvente. Em contrapartida o sistema apresentou valores relativamente altos e positivos para a energia livre de Gibbs. Contudo, vale salientar que para efeito de comparação, é importante avaliar o efeito da temperatura na reação enzimática para que não ocorra o equívoco de concluir que a energia de Gibbs aumenta com a temperatura. Segundo Heidtmann *et al.* (2012) a energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) de uma enzima é diferente para o estado na forma nativa e forma desnaturada, e indica quanto da conformação inicial ainda está preservada ou ativa.



$\Delta H^\circ$  fornece o número de ligações não covalentes quebradas no processo de desnaturação enzimática (Ortega *et al.*, 2004). Essas ligações rompidas podem ser pontes de hidrogênio, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e força de Van Der Waals. Quando a enzima está na sua forma nativa essas forças ajudam manter a estrutura original, mas com o aumento da temperatura, a enzima pode ser desdobrar devido a clivagem dessas ligações (Anfinsen, 1973). Segundo Pace, (1992) e Ortega *et al.* (2004), assumindo que a força de uma ligação não covalente foi aproximadamente  $5,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , a desnaturação da PG foi acompanhada pela ruptura de aproximadamente 7 ligações não covalentes.

## 4. CONCLUSÃO

Foi possível estimar parâmetros termodinâmicos e cinéticos da poligalacturonase (PG) produzida por *Aspergillus japonicus* URM5620 através de regressão linear com altos coeficientes de correlação. A partir dos dados obtidos pode-se constatar que a PG de *Aspergillus japonicus* URM5620 apresentou boa estabilidade quanto a mudanças de temperaturas em baixas temperaturas (30 a 50°C). A PG apresentou baixa energia de ativação da reação, o que diminui os custos de produção sendo uma boa alternativa para futuras aplicações industriais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANFINSSEN, C. B. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science*, v. 181, n. 4096, p. 223-230, 1973.
- BRUNE, W. *Cálculo cinético em reações enzimáticas*. Viçosa: Empresa Universitária – UFV, 1978. 83p.
- CHELLEGATTI, M. A. S. C.; FONSECA M. J. V.; SAID, S. Purification and partial characterization of exopolysaccharidase I from *Penicillium frequentans*. *Microbiol Res*, v. 157, n. 1, p. 19-24, 2002.
- DEUNER, S.; FERREIRA, L. S.; BACARIN, M. A.; BERVALD, C. M. P.; ZANATTA, E. R. Caracterização parcial da invertase ácida solúvel em tubérculos de batata: energia de ativação e efeito de inibidores. *R. Bras. Agrociência*, v. 11, n. 1, p. 45-50, 2005.
- EL-LOLY, M. M.; AWAD, A. A.; MANSOUR, A. I. A. Thermal Kinetics denaturation of Buffalo milk Immunoglobulins. *International Journal of Dairy Science*, v. 2, n. 4, p. 292-301, 2007.
- FONTAN, R. C. I.; ALCÂNTARA, L. A. P.; LAJE NETO, S. C. A.; BONOMO, R. C. F.; FONTAN, G. C. R. Cinética de inativação da peroxidase em água de coco. *Ciências Agrárias*, v. 33, n. 1, p. 249-258, 2012.
- HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P.; BRAGA, A. R. C. Caracterização cinética e termodinâmica de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio *Brazilian J. Food Technol.*, v. 15, n. 1, p. 41-49, 2012.
- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2931–2944, 2005.
- KOBLITZ, M. G. B. *Bioquímica dos Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas*, 1 ed. São Paulo: Lab. Guanabara Koogan. 2008. p 38-44.

- LAVORENTI, A.; ROCHA, A. A.; PRATA, F.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L.; PINTO, O. B. Comportamento do diclosulam em amostras de um latossolo vermelho distroférrico sob plantio direto e convencional. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 27, p. 183-190, 2003.
- MACIEL, M. H. C.; HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; TEIXEIRA, M. S. F.; MOREIRA, K. A.; SOUZA-MOTTA, C. M. Production and partial characterization of pectinases from forage palm by *Aspergillus niger* URM4645. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n.13, p. 2469-2475, 2011.
- MAISURIA, V. B.; PATEL, V. A.; NERURKAR A. S. Biochemical and thermal stabilization parameters of polygalacturonase from *Erwiniacarotovora* subsp. *carotovora* BR. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 20, n. 7, p. 1077-1085, 2010.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* v.31, p. 426-428, 1959
- 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.
- ORTEGA, N. *et al.* 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. *J. Mol. Biol.*, v. 226, p. 29-35, 1992.
- PALANIVELU, P. Polygalacturonases: Active site analyses mechanism of action. *Indian Journal of Biotechnology*. v. 5, p. 148-162, abril. 2006.
- PEDROLI, D. B.; MONTEIRO, A. C.; GOMES, E.; CARMONA, E. C. Pectin and pectinases: production, characterization and industrial application of microbial pectinolytic enzymes. *The Open Biotechnology Journal*, v. 3, p. 9-18, julho. 2009.
- PETERSSON, G. A. Perspective on "The activated complex in chemical reactions" Eyring H (1935) *J Chem Phys* 3: 107. *Theor Chem Acc*, v. 103, p. 190-195, 2000.
- PORTO, T. S. PORTO, C. S.; CAVALCANTI, M. T. H.; LIMA FILHO, J. L.; PEREGO, P.; PORTO, A. L. F. Kinetic and thermodynamic investigation on ascorbate oxidase activity and stability of a *Cucurbita maxima* extract. *Biotechnol Prog.*, v. 22, n. 6, p. 1637-1642, 2006.
- 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.
- SANTOS, S. F. M.; SOUZA, R. L. A.; ALCÂNTARA, S. R.; PINTO, G. A. S.; SILVA, F. L. H.; MACEDO, G. R. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção de pectinase por fermentação em estado sólido do pedúnculo de caju. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v.10, n.2, p.101-109, 2008.
- SOARES, M. M. C. N.; SILVA, R.; GOMES E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Rev. Microbiol.*, v. 30, n.4, p. 299-303, 1999.
- SOUZA, R. L. A. OLIVEIRA, L. 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, n. 9, p. 987-992, 2010.
- TARI, C.; DOGAN, N.; GOGUS, N. Biochemical and thermal characterization of crude exo-polygalacturonase produced by *Aspergillus sojae*. *Food Chemistry*, v. 111, p. 824-829, 2008.