

Artigo

Extração, Caracterização e Purificação Parcial da Pectina Liase do Albedo de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg.

Casagrande, J.;* Machado, A. T. P.; Silva, M.; Canteri, M. H. G.

Rev. Virtual Quim., 2017, 9 (6), 2214-2225. Data de publicação na Web: 23 de outubro de 2017

<http://rvq.sbq.org.br>**Extraction, Characterization and Partial Purification of the Pectin Lyase from *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg mesocarp**

Abstract: The yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg) is a tropical fruit widely cultivated, consumed and industrialized in Brazil, especially in the production of juices. The peel of passion fruit consists essentially of mesocarp (albedo), rich in pectin, potentially functional in industrial and technological processes. But, due to the presence of the action of pectinolytic enzymes such as pectin lyase (PL), there may be changes that decrease their use as raw material to pectin extraction. Due to its important application, PL has already been characterized in 122 species including bacteria, fungi and yeasts, although there are few reports on sources of plant origin. In this context, this work aims the extraction, enzymatic characterization and partial purification of PL from the albedo of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg., a source even unprecedented for this enzyme. The results indicated that, after extracting, the enzymatic assay of the sample at a concentration of 70 g.L⁻¹ for 72 h showed PL activity with reduction of kinematic viscosity of 53.7% in high methoxyl pectin (HM). The spectrophotometric test indicated enzyme activity of 547.3 U.g⁻¹ and 9121.2 nkat.g⁻¹ and this sample was selected for the other analyzes. The enzyme characterization indicated that 5.5 is the optimum pH of the enzyme. Fractionated precipitation with 30% ethanol (v/v) showed the highest activity of PL and analysis by SDS-PAGE (12%) of the chromatography fractions revealed non-pure fractions of PL.


Keywords: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg; Pectin lyase; Enzymatic Assay; Purification.

Resumo

O maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg) é um fruto tropical amplamente cultivado, consumido e industrializado no Brasil, principalmente na produção de sucos. A casca do maracujá é constituída essencialmente pelo mesocarpo (albedo), rico em pectina, potencialmente funcional em processos industriais e tecnológicos. Mas, devido à presença da ação de enzimas pectinolíticas, como a pectina liase (PL), podem haver alterações que diminuam sua aplicação como matéria-prima para extração de pectina. Devido a sua importante aplicação, a PL já foi caracterizada em 122 espécies compreendendo bactérias, fungos e leveduras, embora sejam escassos os relatos sobre fontes de origem vegetal. Neste contexto, o presente trabalho visa a extração, a caracterização enzimática e a purificação parcial da PL a partir do albedo de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg., fonte ainda inédita para essa enzima. Os resultados indicaram que, após a extração, o ensaio enzimático da amostra na concentração de 70 g.L⁻¹ durante 72 h revelou atividade da PL com queda de viscosidade cinemática de 53,7% na pectina de alto grau de metoxilação (AGM). O teste espectrofotométrico indicou atividade enzimática de 547,3 U.g⁻¹ e 9121,2 nkat.g⁻¹, e esta amostra foi selecionada para as demais análises. A caracterização enzimática indicou que 5,5 é o pH ótimo da enzima. A precipitação fracionada com etanol a 30% (v/v) apresentou maior atividade da PL e a análise por SDS-PAGE (12%) das frações da cromatografia aniônica revelou frações não puras da PL.

Palavras-chave: *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg; Pectina liase; Ensaio Enzimático; Purificação.

* Universidade Estadual de Ponta Grossa, Centro Interdisciplinar de Pesquisa e Pós-Graduação – CIPP, Av. Gal. Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, CEP 84030-9000, Ponta Grossa-PR, Brasil.

 jeh0902@gmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20170131](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170131)

Extração, Caracterização e Purificação Parcial da Pectina Liase do Albedo de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg.

Jéssica Casagrande,^{a,*} Agnes T. P. Machado,^b Marcio Silva,^c Maria H. G. Canteri^d

^a Universidade Estadual de Ponta Grossa, Centro Interdisciplinar de Pesquisa e Pós-Graduação – CIPP, Av. Gal. Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, CEP 84030-9000, Ponta Grossa-PR, Brasil.

^b Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Química, Av. Gal. Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, CEP 84030-9000, Ponta Grossa-PR, Brasil.

^c Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Departamento de Ensino, Av. Monteiro Lobato, km 04 s/n - Jardim Carvalho, CEP 84016-210, Ponta Grossa-PR, Brasil.

^d Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Departamento de Alimentos, Av. Monteiro Lobato, km 04 s/n - Jardim Carvalho, CEP 84016-210, Ponta Grossa-PR, Brasil.

* jeh0902@gmail.com

Recebido em 21 de outubro de 2016. Aceito para publicação em 9 de outubro de 2017

1. Introdução

2. Procedimento Experimental

- 2.1.** Preparação dos frutos
- 2.2.** Extração da Pectina liase (PL)
- 2.3.** Ensaio enzimático por viscosímetro
- 2.4.** Ensaio enzimático por espectrofotômetro
- 2.5.** Efeito do pH
- 2.6.** Purificação parcial da PL
- 2.7.** Análise estatística

3. Resultados e Discussão

- 3.1.** Efeito do pH
- 3.2.** Ensaio enzimático por viscosímetro
- 3.3.** Ensaio enzimático por espectrofotômetro
- 3.4.** Purificação parcial da PL

4. Conclusão

1. Introdução

O maracujá, fruto do maracujazeiro, uma planta pertencente à ordem Passiflorales, da família Passifloraceae e ao gênero *Passiflora*¹, apresenta em torno de 465 espécies, compreendendo plantas trepadeiras herbáceas ou lenhosas.¹ O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* O. Deg) compreende a principal variedade explorada, cultivada e consumida no Brasil, devido à qualidade de seus frutos. Na produção de sucos, somente cerca de 30% do fruto é aproveitado, gerando grande quantidade de resíduos, principalmente cascas (epicarpo e mesocarpo) e sementes.²⁻³ A casca do maracujá é constituída essencialmente pelo mesocarpo (albedo), rico em pectina, substância que, em função das condições de

extração e da origem da matéria-prima, pode apresentar tanto baixa metoxilação⁴ quanto alta metoxilação.⁵ A pectina é considerada um subproduto, mas pode ser reaproveitada e utilizada em diversos processos industriais, como na formação de gel para uso como espessante e estabilizante em produtos alimentícios.^{2,3,6,7} Porém, um dos fatores que pode causar a perda de qualidade do albedo é a ação de enzimas pectinolíticas.^{8,9}

A enzima pectina liase (PL) (EC 4.2.2.10) encontra-se entre as pectinases de maior interesse, pois degrada o polímero pelo mecanismo direto de β -eliminação, resultando na formação de oligogalacturonídeos 4,5-insaturados (Figura 1). Já, as outras pectinases (PG e PME) atuam degradando completamente a estrutura da pectina, liberando metanol como um produto.¹⁰⁻¹²

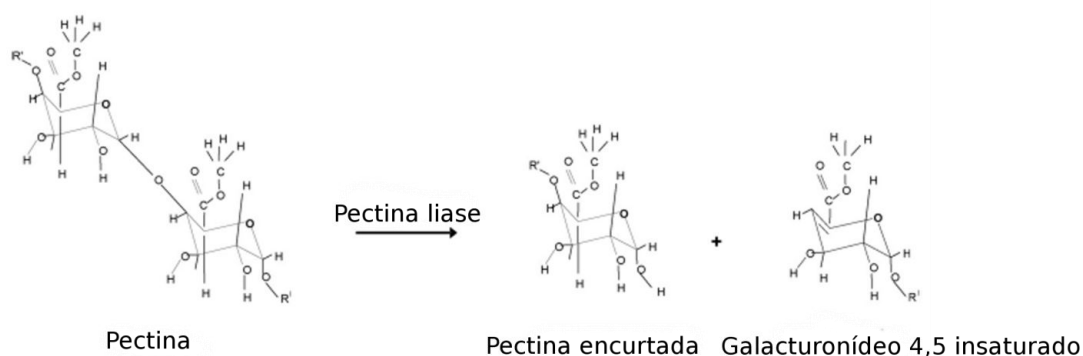


Figura 1. Mecanismo de ação da pectina liase¹³

As enzimas pectinolíticas são amplamente utilizadas na indústria de sucos de frutas atuando na clarificação dos sucos e aumentando a eficiência da filtração, com redução de 50% do tempo deste processo.¹⁴⁻¹⁵ Complementarmente, são adicionadas na produção de vinhos, chá e café, acelerando o processo de fermentação, na extração de óleos vegetais e extrato de tomate, aumentando a qualidade de antioxidantes e o rendimento, na redução do amargor de cascas de cítricos e na influência da firmeza de produtos processados (pickles).¹⁶⁻¹⁷

Devido a sua importante aplicação, a PL já

foi caracterizada em 122 espécies compreendendo bactérias, fungos e leveduras, mas são escassos os relatos sobre fontes de origem vegetal.¹⁰ Neste contexto, o presente trabalho visa a extração, caracterização enzimática e purificação parcial da PL a partir do albedo de *P. edulis* f. *flavicarpa* O. Deg, uma fonte ainda inédita para essa enzima.

2. Procedimento Experimental

2.1. Preparação dos frutos

Os frutos de *P. edulis* f. *flavicarpa* O. Deg, com coloração amarelo intenso, textura lisa e ausência de manchas e injúrias foram selecionados e mantidos a 4 °C. Cada maracujá foi lavado em água corrente e imerso por 15 min em água clorada na proporção de 10 mL por litro de solução de hipoclorito de sódio comercial com 2,5% de cloro ativo (Da Ilha®), com concentração final de 250 ppm, para eliminar possível carga microbiológica no exterior do fruto, em temperatura ambiente (19-23 °C), sem enxágue posterior, secando os frutos com auxílio de toalhas de papel. Os frutos foram descascados com espessura aproximada de 2 mm e cortados para a separação da polpa. O albedo sem a polpa e sem o flavedo (parte amarela) foi cortado em quatro partes e congelado a -80 °C por 24 h. Em seguida, o material foi submetido ao processo de liofilização (Liofilizador L101- Liotop), por 48 h. O material liofilizado foi triturado mecanicamente em fatiador elétrico (Skymse, Santa Catarina, Brasil) e armazenado em frascos hermeticamente vedados a 4 °C.

2.2. Extração da pectina liase (PL)

A extração da PL dos frutos de *P. edulis* f. *flavicarpa* O. Deg foi realizada com base no método descrito por Muchuweti et al. (2005),¹⁸ com adaptações. Para tanto, 0,192 kg de albedo liofilizado foi solubilizado em tampão STCS (citrato de sódio 50 mM pH 5,5; NaCl 1,7 mol.L⁻¹ e EDTA 1,5 mM) na razão 1:12,5, seguida de centrifugação a 4 °C, 20.000 × g por 30 min. O sobrenadante foi liofilizado e com o pó resultante foram preparadas três soluções com as concentrações: 20 g.L⁻¹, 35 g.L⁻¹ e 70 g.L⁻¹.

2.3. Ensaio enzimático por viscosímetro

O ensaio de atividade enzimática da PL foi realizado em viscosímetro capilar (Cannon-Fenske Routine Viscometer, size 100, serial number y44, State College, EUA), segundo método de Alkorta et al. (1995)²⁰ com modificações, e todas as análises foram realizadas em triplicatas.

As amostras de pectina, AGM (Pectina CPKelco, 115-MRS, Atlanta, Georgia) pectina de alto grau de metoxilação (PAGM)²¹ e BGM (Pectina CPKelco, LM 18-CG, Atlanta, Georgia) pectina de baixo grau de metoxilação (PBGM)²¹, foram submetidas a radiação ultravioleta (UV) em câmara de fluxo laminar (BioSeg 12, tipoA1, série F1-14790, São Paulo, Brasil) por 30 minutos.

Os tubos falcon de 50 mL foram higienizados com etanol 70% e esterilizados em forno de micro-ondas (Electrolux, Mep41, Manaus, Brasil) por 30 min (potência alta: 100% - 1000 W). Após o procedimento, foi adicionado tampão STCS (20 mL) contendo solução a 0,5% de pectina cítrica (PAGM ou PBGM) como substrato e 1 mL de extrato enzimático bruto. Em seguida, os tubos foram agitados e mantidos em banho (Dubnoff, Quimis, Diadema, São Paulo) a 45 °C. Dois controles foram utilizados, o primeiro constituído por 20 mL de PAGM 0,5 % adicionada de 1 mL de tampão STCS e o outro com 20 mL de PBGM 0,5%, adicionada de 1 mL de tampão STCS. Todo procedimento de preparo da amostragem foi realizado com o bico de Bunsen ligado. Após 24, 48 e 72 h, foram realizadas medidas do tempo de escoamento. A viscosidade cinemática de cada amostra foi calculada em centistokes, multiplicando-se o tempo de escoamento em segundos pela constante cujo valor é 0,01376 mm².s⁻² cSt.s⁻¹.²²

2.4. Ensaio enzimático por espectrofotômetro

O ensaio de atividade enzimática da PL foi

realizado pelo método de De Vries et al. (1982), descrito por Oiv (2014)²³ com adaptações. Todas as análises foram em triplicatas a 1, 2, 5, 10 e 15 min. A mistura reacional era composta por 400 µL de tampão Mc Ilvaine (50% de solução de ácido cítrico 100 mM, 50% de solução de bifosfato de sódio 200 mM, pH 5,5), 100 µL de solução enzimática e 500 µL de PAGM 1%, enquanto que na amostra controle, a solução enzimática foi substituída por igual volume de tampão Mc Ilvaine. A reação enzimática foi mantida por 5 min a 25 °C, tempo após o qual a reação foi interrompida com aquecimento a 100 °C por 30 s, seguida de adição de 100 µL de NaOH 1 mol.L⁻¹ e diluição até um décimo com água destilada para as leituras a 235 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Femto, 800 XI, São Paulo, Brasil). A atividade enzimática (U.g⁻¹) foi calculada por meio do melhor tempo de absorbância, seguindo Oiv (2014)²³ e também foi determinado em nanokatals.

2.5. Efeito do pH

O estudo do efeito do pH ótimo foi realizado com tampão citrato de sódio 1,7 mol.L⁻¹ nos pHs: 3, 5,5, 7 e 9.

2.6. Purificação parcial da PL

As amostras foram submetidas a precipitações fracionadas com etanol a 30% (v/v) e 60% (v/v) como descrito em Trentine et al. (2015).²⁴ O precipitado foi separado por centrifugação a 20.000 × *g* por 14 min e solubilizado em 20 mL de tampão STCS. Posteriormente, foi feita a filtração em TNT 100% polipropileno. Em seguida, foram realizados os testes de atividade pelo método espectrofotométrico e pelo método em viscosímetro capilar.

As amostras contendo a PL foram reunidas, concentradas e submetidas a cromatografia no cromatógrafo Äkta Purifier (GeHealthcare Life Sciences) em coluna de troca iônica aniônica de 1 mL Q-Sepharose E (GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (VC) com tampão A (tampão citrato de sódio 0,005 mol.L⁻¹ pH 5,5), seguida da injeção da amostra com uso de seringa, com eluição de 7 VC com tampão A. Após foi eluído 26 VC de gradiente entre 0 a 100% do tampão STCS. As frações da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE (12%)²⁵ e submetidas ao ensaio da atividade enzimática pelo método espectrofotométrico. A quantificação da proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).²⁶

2.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software SASMAgri (8.2) por meio da análise de variância (ANOVA), em nível de significância de 5%, seguida do teste de Tukey, quando aplicável.²⁷

3. Resultados e Discussão

3.1. Efeito do pH

Os resultados indicaram (Figura 2) o pH ótimo como 5,5, dentre as faixas de pH analisadas, com viscosidade cinemática de 0,69 cSt.s⁻¹ em 72 h. Segundo Awasthi (2011)²⁸ a viscosidade de soluções coloidais de pectina diminui com o aumento de pH, comportamento observado no gráfico da figura 2, no qual à medida em que se aumenta o pH, a viscosidade diminui.

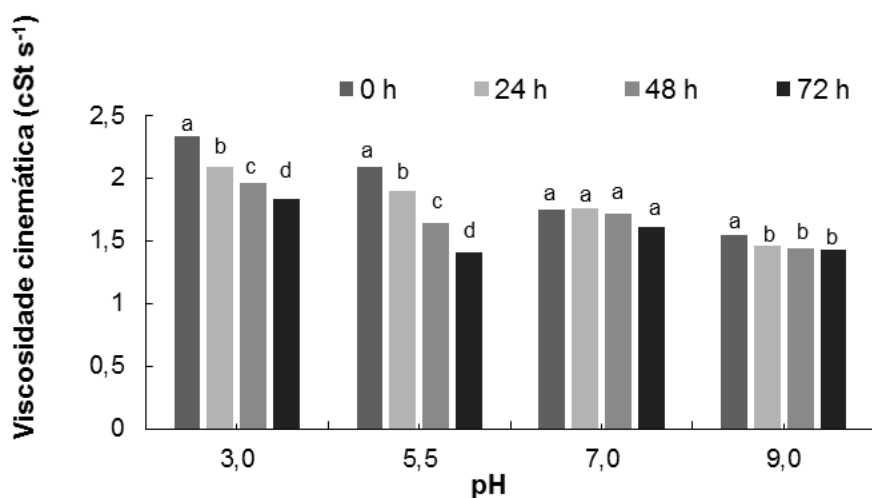


Figura 2. Viscosidade cinemática (cSt.s⁻¹) do extrato enzimático bruto em pH 3, 5,5, 7 e 9, a cada 24 h. durante 72 h. Letras minúsculas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância

3.2. Ensaio enzimático por viscosímetro

O ensaio enzimático foi realizado no pH 5,5 ótimo previamente determinado e na temperatura de 45 °C como descrito em Fennema (2010). O gráfico (Figura 3) indica uma queda de viscosidade de 0,69 cSt.s⁻¹ em 72 h para a PAGM, e 0,31 cSt.s⁻¹ para a PBGM, o que sugere a ação da PL extraída. No início dos ensaios deste trabalho, acreditava-se que a principal enzima de degradação do albedo de maracujá seria a poligalacturonase. Entretanto, esta age fundamentalmente na queda de viscosidade sobre PBGM, que apresentou menor queda de viscosidade. Em função disso, foi possível presumir que a enzima em estudo neste trabalho era a PL, visto que atuou com mais intensidade na queda de viscosidade em PAGM. Para os controles, foram obtidos os valores médios de 1,8 cSt.s⁻¹ e 1,1 cSt.s⁻¹ respectivamente, sem queda de viscosidade considerável no decorrer das 48 h comparativamente à amostragem substrato e enzima.

Ao comparar a viscosidade de uma suspensão coloidal de uma PAGM, com a adição do extrato bruto enzimático houve diferença estatística entre os tratamentos no decorrer do tempo. O valor de F calculado (61,17) obtido na ANOVA foi superior ao F tabelado (4,06) para um nível de 5% de significância. Para o controle, não houve diferença significativa entre os diferentes tempos, pois F calculado (0,62) foi inferior ao F tabelado (4,06) para um nível de 5% de significância. Além disso, não houve diferença estatística entre os ensaios com a PBGM.

O rendimento da liofilização do extrato bruto foi de 28,5%. Na Figura 4, está apresentada a avaliação da atividade nas soluções enzimáticas obtidas na concentração de 20 g.L⁻¹, 35 g.L⁻¹ e 70 g.L⁻¹, com queda de viscosidade cinemática de 0,69 cSt.s⁻¹, 0,92 cSt.s⁻¹ e 1,52 cSt.s⁻¹, respectivamente. Em relação à amostra controle, não houve diferença significativa no decorrer do tempo, pois o F tabelado (4,06) foi superior ao F calculado na ANOVA (0,62) para um nível de 5% de significância.

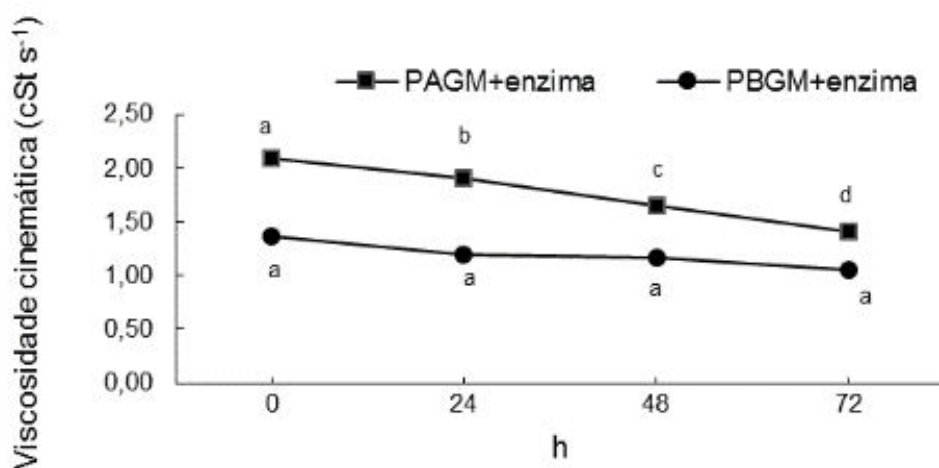


Figura 3. Viscosidade cinemática (cSt.s⁻¹) das amostras de pectina PAGM e PBGM com adição do extrato enzimático. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância

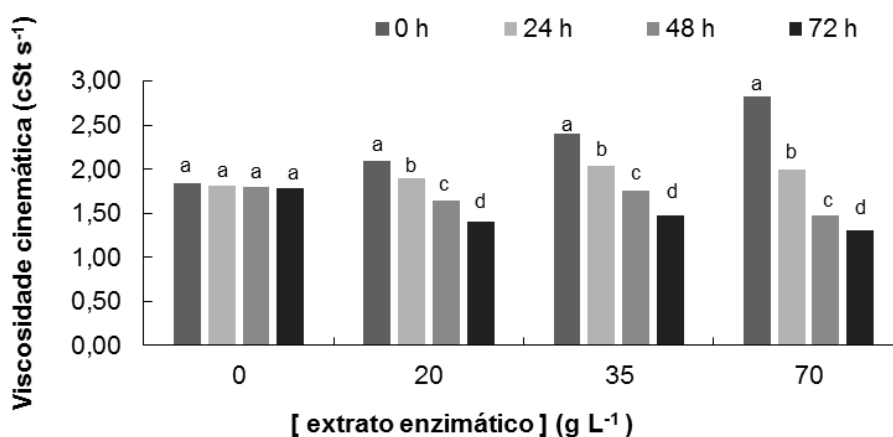


Figura 4. Viscosidade cinemática (cSt.s⁻¹) do extrato enzimático bruto nas concentrações de 0 g.L⁻¹, 20 g.L⁻¹, 35 g.L⁻¹ e 70 g.L⁻¹. corresponde a amostra controle. Letras minúsculas indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância

3.3 Ensaio enzimático por espectrofotômetro

A partir dos dados de absorvância, foi calculada a atividade em extrato bruto em U.g⁻¹ e nkat.g⁻¹. O extrato enzimático bruto apresentou atividade de 547 U.g⁻¹ e 9121 nkat.g⁻¹, em 15 min (maior absorvância), como se indica na Figura 5.

O aumento da absorvância ao longo do tempo representa a ação da enzima PL que atua por eliminar oligogalacturonídeos 4,5-insaturados e ácido galacturônico da estrutura da pectina.^{23,29,30} O valor de F calculado obtido na ANOVA foi de 386,64 superior ao de F tabelado (4,06) para um nível de 5% de significância. Para o controle não houve diferença significativa, pois, o F tabelado (4,06) foi superior ao F calculado (0,75), para um nível de significância de 5%.

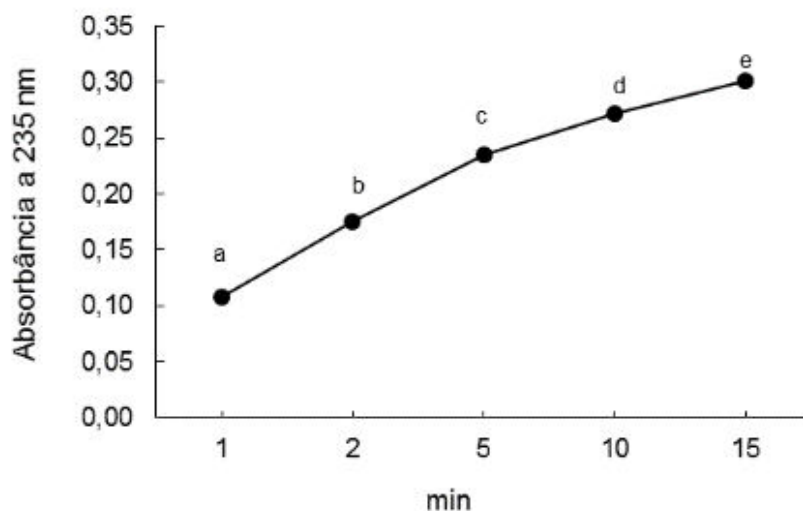


Figura 5. Atividade enzimática da PL em extrato enzimático bruto a partir da leitura da absorbância a 235nm. Letras minúsculas diferentes para uma mesma linha indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância

3.4. Purificação parcial da PL

A precipitação fracionada com 60% com etanol não apresentou atividade, entretanto a precipitação fracionada com etanol a 30% (v/v) apresentou percentual de queda de

8,51% após 72 h em relação ao controle, com apenas 1,9% de queda de viscosidade na avaliação da atividade pelo método do viscosímetro. Na avaliação por espectrofotometria (Figura 6), o precipitado apresentou atividade de 680 U.g^{-1} e $11333 \text{ nkat.g}^{-1}$.

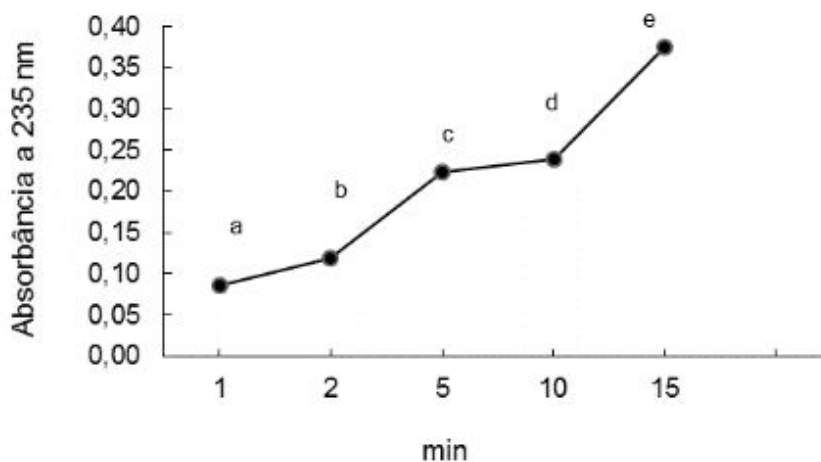


Figura 6. Atividade enzimática da PL a partir da leitura da absorção a 235nm no extrato enzimático após precipitação com etanol 30% (v/v). Letras minúsculas diferentes para uma mesma linha indicam diferença estatística ao nível de 5% de significância

Na Figura 7A, está ilustrado o cromatograma da purificação da PL. Um pico majoritário pode ser observado, durante a eluição do tampão A. A análise das frações do tubo 1 ao 9 por SDS-PAGE (12%) (Figura 7B) revelou que uma proteína, possivelmente a PL, com massa molecular média de 35 kDa, foi eluída não pura. Para dedução de que essa proteína era a PL, tem-se como referência as massas molares de PL de outras fontes como *Penicillium canescens* com 38kDa,³¹ *Aspergillus sojae* com 32 kDa,³²

Erwinia aroideae 28 kDa,³³ *Fusarium oxysporum* com 18k Da³⁴ e *Rhizoctonia solanit* com 35 kDa.³⁵

Após a purificação por cromatografia as frações 1 ao 9 foram reunidas e submetidas ao ensaio enzimático, para identificação da atividade da PL. Na Figura 8, está representado o ensaio por espectrofotômetro, no qual é possível observar o aumento da absorbância no decorrer do tempo.

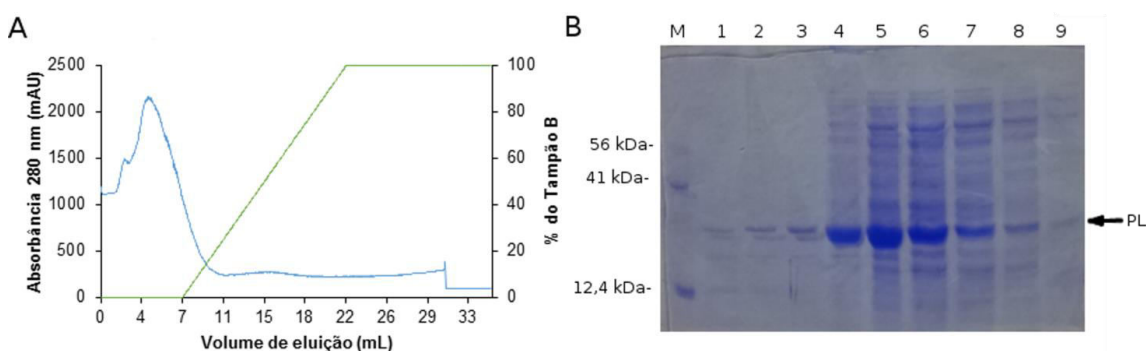


Figura 7. A) Cromatograma de troca aniônica com as amostras do precipitado 30%. B) SDS-PAGE (12%), raia M: marcador de massa molar, raia 1 a 9: frações 1 ao 9 do cromatograma

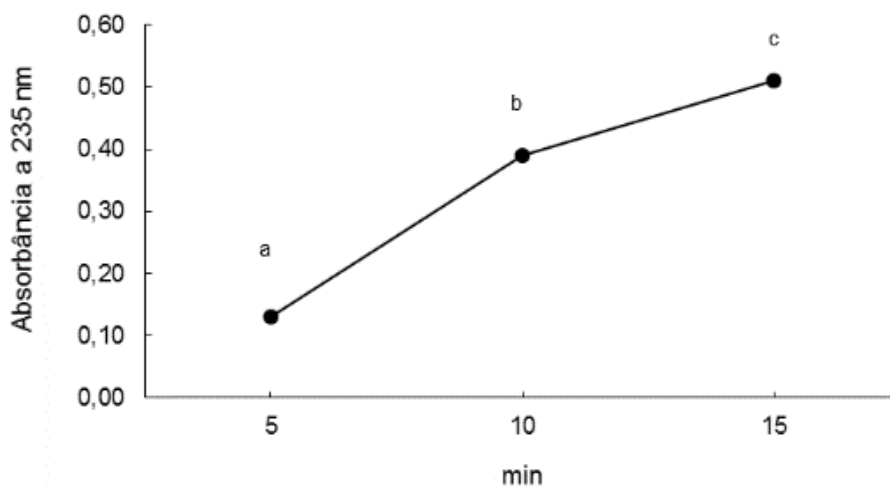


Figura 8. Ensaio enzimático por espectrofotômetro em λ a 235 nm

O valor da atividade enzimática foi de 925 U.g^{-1} e 15424 $\text{nkat.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$. A atividade enzimática da PL de *P. edulis* f. *flavicarpa* O. Deg. após purificação parcial é maior em comparação com a de *Penicillium canescens*³¹ com valor de 28 U.mg^{-1} , em pH 5,0 e a 235

nm, mas menor para a PL de *Aspergillus tamaritii*³⁶ cujo valor é de 5670 U.g^{-1} após 6 dias de incubação em pH 7 – 8,5 a 40 °C. Ao utilizar *Aspergillus oryzae*³⁷ para produção da PL a partir de resíduos agroindustriais, o valor

da atividade foi de 313 U.mL⁻¹ em cascas de limão e 290 U.mL⁻¹ em cascas de laranja.

4. Conclusão

Identificou-se a presença da PL, por meio de ensaios de viscosidade e espectrofotométricos, no extrato aquoso produzido a partir do albedo liofilizado do maracujá amarelo, fonte inédita para essa enzima. Dentre as faixas de pH estudadas, o pH ótimo estimado dessa PL foi 5,5. A precipitação com etanol 30% (v/v) apresentou atividade enzimática considerável de 925 U.g⁻¹. A cromatografia aniônica forneceu frações não puras contendo a PL e, por isso, novas etapas de cromatografia serão necessárias para obtenção da enzima pura, bem como novos estudos em outras fontes vegetais, visto a dificuldade em encontrar relatos de extração, caracterização e purificação destas enzimas nessas fontes.

Agradecimentos

À CAPES, pelas Bolsas concedidas; ao CNPq, por verba para financiamento de pesquisa (Processo 487621/2012-3 – APQ) e às Instituições UTFPR e UEPG, por disponibilizarem suas instalações para os ensaios e análises. À empresa CP Kelco Brasil (Limeira, São Paulo), pela doação das amostras de pectina com alto e baixo grau de metoxilação.

Referências Bibliográficas

¹ Faleiro, G. F.; Nilton, T. V. J.; Marcelo, F. B. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - Desafios da pesquisa. *Embrapa Cerrados* 2005, p. 1-25. [link]

² Figueiredo, L. P.; Valente, W. A.; Dias, M. V.; Borges, S. V.; Pereira, P. A. P.; Pereira, A. G. T.; Clemente, P. R. Efeito da adição de suco

de maracujá e tempo de cozimento sobre a qualidade de doces do albedo de maracujá em calda. *Revista Ciência e Tecnologia em Alimentos* **2009**, *29*, 840. [CrossRef]

³ Nascimento, E. M. G. C.; Ascheri, J. L. R.; Carvalho, C. W. P.; Galdeano, M. C. Benefícios e perigos do aproveitamento da casca de maracujá (*Passiflora edulis*) como ingrediente na produção de alimentos. *Revista Instituto Adolfo Lutz* **2013**, *72*, 1. [link]

⁴ Yapo, B. M.; Koffi, K. L. Yellow passion fruit rind- a potential source of low-methoxyl pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 2738. [CrossRef] [PubMed]

⁵ Canteri, M. H. G.; Scheer, A. P.; Ginies, C.; Reich, M.; Renard, C. M. C. G.; Wosiacki, G. Rheological and macromolecular quality of pectin extracted with nitric acid from passion fruit rind. *Journal of Food Process Engineering* **2012**, *35*, 800. [CrossRef]

⁶ Seixas, F. L.; Fukuda, D. L.; Turbiani, F. R. B.; Garcia, P. S.; Petkowicz, C. L. de O.; Jagadevan, S.; Gimenes M. L. Extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) by microwave-induced heating. *Food Hydrocolloids* **2014**, *38*, 186. [CrossRef]

⁷ Canteri, M. H. G.; Moreno, L.; Wosiacki, G.; Scheer, A. P. Pectina: da matéria prima ao produto final. *Polímeros* **2012**, *22*, 149. [CrossRef]

⁸ Amadó, S. G. R. Pectic substances from red beet (*Beta vulgaris conditiva*). Part I. Structural analysis of rhamnogalacturonan I using enzymic degradation and methylation analysis. *Carbohydrate Polymers* **2001**, *4*, 63. [CrossRef]

⁹ Whitaker, J. R. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit. *Enzyme Microbiology Technology* **1984**, *6*, 341. [CrossRef]

¹⁰ Brenda Enzymes. Information on EC 4.2.2.10 - pectin lyase and Organism(s) *Cucumis sativus*. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=4.2.2.10&Searchword=&organism%5B%5D=Cucumis+sativus>>. Acesso em: 6 dezembro 2015.

- ¹¹ Taragano, V. M.; Pilosof, A. M. R. Application of Doehlert designs for water activity, pH, and fermentation time optimization for *Aspergillus niger* pectinolytic activities production in solid-state and submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* **1999**, *25*, 411. [CrossRef]
- ¹² Spagna, G.; Pifferi, P. G. The purification of a commercial pectinase from *A. niger*. *Food Chemistry* **1994**, *50*, 343. [CrossRef]
- ¹³ Yadav, S.; Yadav, P. K.; Yadav, D.; Yadav, K. D. S. Pectin lyase: a review. *Process Biochemistry* **2009**, *44*, 1. [CrossRef]
- ¹⁴ Santi, L.; Berger, M.; Silva, W. O. B. Pectinases e pectina: aplicação comercial e potencial biotecnológico. *Caderno pedagógico* **2014**, *11*, 130. [Link]
- ¹⁵ Souza, J. V. B.; Silva, E. S.; Maia, M. L. S.; Teixeira, M. F. S. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavispurus* 2A. UMIDA1. *Process Biochemistry* **2003**, *39*, 455. [CrossRef]
- ¹⁶ Sieiro, C.; García-Fraga, B.; López-seijas, J.; Silva, A. F.; Villa, T. G. Microbial Pectic Enzymes in the Food and Wine Industry. *Food Industrial Processes - Methods and Equipment* **2012**, 201. [CrossRef]
- ¹⁷ Kumar PG, Suneetha V. A cocktail enzyme – pectinase from fruit industrial dump sites: A review. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* **2014**, *5*, 1252. [Link]
- ¹⁸ Muchuweti, M.; Moyo, E.; Mushipe, S. Some properties of the polygalacturonase from four Zimbabwean wild fruits (*Uapaca kirkiana*, *Zizphus mauritiana*, *Tamarindus indica* and *Berchemia discolor* fruits). *Food Chemistry* **2005**, *90*, 655. [CrossRef]
- ¹⁹ Huismann, M. M. H.; Oosterveld, A.; Schols, H. A. Fast determination of the degree of methyl esterification of pectins by head-space GC. *Food Hydrocolloids*, **2004**, *18*, 665. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁰ Alkorta, I; Garbisu, C.; Liama, M. J.; Serra, J. L. Viscosity decrease of pectin and fruit juices catalyzed by pectin lyase from *Penicillium italicum* in batch and continuous-flow membrane reactors. *Biotechnology Techniques* **1995**, *9*, 95. [CrossRef]
- ²¹ Sambrook, J.; Russel, D. W. Molecular Cloning. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001. [link]
- ²² Cannon instrument company. Certificate of Calibration Cannon-Fenske Routine Viscometer. State College 2014. [Link]
- ²³ OIV - L'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. CODEX CENOLOGIQUE INTERNATIONAL. Pectinase (activité Pectinase). Disponível em : < <http://www.oiv.int/public/medias/4341/f-coei-1-actply.pdf>>. Acesso em : 14 maio 2014.
- ²⁴ Trentine, M. M. S.; Toniazzi, G.; Zeni, J.; Pili, J.; Luccio, M. D.; Valduga, E. Purification of pectinases from *Aspergillus niger* ATCC 9642 by ethanol precipitation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2015**, *4*, 315. [CrossRef]
- ²⁵ Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁶ 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* **1976**, *72*, 248. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁷ Canteri, M. G.; Althaus, R. A.; Virgens F. J. S.; Giglioti, E. A.; Godoy, C. V. SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação* **2001**, *1*, 18. [Link]
- ²⁸ Awasthi, R. Selection of pectin as pharmaceutical excipient on the basis of rheological behavior. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2011**, *3*, 229. [Link]
- ²⁹ Roboz, E.; Barratt, R. W.; Tatum, E. L. Breakdown of pectic substances by a new enzyme from *Neurospora*. *The Journal Biological Chemistry* **1953**, *195*, 459. [PubMed]
- ³⁰ Albersheim, P. Pectin lyase from fungi. *Methods of Enzymology* **1966**, *8*, 628. [CrossRef]

- ³¹ Sinitsyna, O. A.; Fedorova, E. A.; Semenova, M. V.; Gusakov, A. V.; Sokolova, L. M.; Bubnova, T. M. Isolation and characterization of extracellular pectin lyase from *Penicillium canescens*. *Process Biochemistry* **2007**, *72*, 565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Ishii, S.; Yokotsuka, T. Purification and properties of pectin trans-eliminase from *Aspergillus sojae*. *Agricultural and Biological Chemistry* **1972**, *36*, 146. [[CrossRef](#)]
- ³³ Kamimiya, S.; Nishiya, T.; Izaki, K.; Takahashi, H. Purification and properties of a pectin trans-eliminase in *Erwinia aroideae* formed in the presence of nalidixic acid. *Agricultural and Biological Chemistry* **1974**, *38*, 1071. [[CrossRef](#)]
- ³⁴ Guevara, M. A.; Gonzalez-Jaen, M. T.; Estevez, P. Pectin lyase from *Fusarium oxysporum f. sp. radidis lycopersici*: purification and characterization. *Biotechnololy Progress* **1996**, *14*, 747. [[CrossRef](#)]
- ³⁵ Bugbee, W. M. Purification and characteristics of pectin lyase from *Rhizoctonia solanit*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **1990**, *36*, 15. [[CrossRef](#)]
- ³⁶ Amande, T.; Adebayo-Tayo, B.; Ndubuisi-Nnaji, U.; ADO, B. A. Production and partial characterization of pectinases from mango peels by *Aspergillus tamarii*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* **2013**, *3*, 59. [[Link](#)]
- ³⁷ Koser, S.; Anwar, Z.; Iqbal, Z.; Anjum, A.; Aqil, T.; Mehmood, S.; Irshad, M. Utilization of *Aspergillus oryzae* to produce pectin lyase from various agro-industrial residues. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* **2014**, *7*, 327. [[CrossRef](#)]