



Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Biologia Celular – CEL
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana - PPGBioMicro

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS POR
Paecilomyces formosus EM RESÍDUOS SÓLIDOS DO PROCESSAMENTO DE CAFÉ**

Rafael Ícaro Matos Vieira

Brasília-DF, Julho de 2023

Universidade de Brasília

Departamento de Biologia Celular – CEL
Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana - PPGBioMicro

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS POR
Paecilomyces formosus EM RESÍDUOS SÓLIDOS DO PROCESSAMENTO DE CAFÉ**

Rafael Ícaro Matos Vieira

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília como pré-requisito para a obtenção do título de mestre em Biologia Microbiana.

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho

Brasília-DF

2023

Produção e caracterização de enzimas pectinolíticas por *Paecilomyces formosus* em
resíduos sólidos do processamento de café

Rafael Ícaro Matos Vieira

Dissertação de Mestrado

Banca examinadora

Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte

Prof. Dr. Luis Henrique Ferreira do Vale

Prof. Dr. Helder Andrey Rocha Gomes (Suplente)

À minha mãe, Cleide.

À minha irmã, Jordana.

DEDICO

Agradecimentos

À minha família principalmente, por ter me apoiado nesta decisão, pela paciência, compreensão, carinho e amor que tenho recebido, eu teria conseguido nada nesta vida sem vocês. À minha irmã, Jordana, por me dar conselhos e se preocupar a todo tempo. À minha mãe, Cleide, por sempre estar presente, conversar e me ser o meu pilar. Amo vocês do fundo do meu coração.

Ao professor Edivaldo, por ter me colocado neste projeto, que me acolheu em seu laboratório, que me forneceu todo o aprendizado, me ajudando quando precisei, agradeço por tudo.

À professora Eliane por todos os conselhos e ensinamentos. Muito obrigado.

Aos antigos orientandos do grupo de pesquisa. Ao Guilherme, por sempre me ouvir, me auxiliar nos momentos críticos; Carol, por me dar todo o apoio, me guiar em todo o processo dos experimentos; Helder, que me ajudou muito e me ajuda até hoje, por me ouvir, auxiliar e treinar.

Aos meus amigos que fiz no laboratório, Tay, Raul, Jéssica F., Jéssica P., Gabi, Helena, Vini, João, Rosa, entre outros tantos que passaram e estão no laboratório. Muito obrigado pelas risadas, abraços, conselhos importantíssimos, pelos lanches juntos, por todo ensinamento e pela companhia de todo dia, vocês são o motivo de eu ter conseguido chegar até o final do mestrado, são a força que me fez continuar. Fico muito feliz por ter cada um de vocês por perto.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana (PPGBioMicro), à Universidade de Brasília pelo suporte, pelos recursos, toda estrutura que ofertada para se fazer possível o desenvolvimento deste projeto. Os professores aos quais cursei as disciplinas, por todo conhecimento adquirido.

Aos meus amigos que estão distantes, sempre me apoiando, sendo pacientes e compreensivos por estar longe, agradeço por todas as palavras de carinho.

À todos meus amigos, vizinhos e moradores da colina, Manu, Paola, Barbara, Laura, Jack, Danilo, Gabriel, Willem, Frankie e Wellington. Cada um de vocês me proporcionou momentos incríveis, conversas, conselhos, festas e outros. Eu tenho um carinho especial por todos.

À cada um que de forma direta ou indireta me auxiliou neste caminho.

Muito obrigado!

Apoio financeiro

Este trabalho foi desenvolvido com suporte financeiro da FAPDF (Fundação de amparo à Pesquisa do Distrito Federal).

Resumo

O Brasil se destaca como o maior produtor mundial de café, com mais de 50 milhões de sacas de café produzidas anualmente, após o beneficiamento do café há geração de resíduos (casca, polpa, mucilagem) na mesma proporção, chegando até 50% da produção total. Neste trabalho foi pesquisado o potencial de produção da enzima pectinase pelo *Paecilomyces formosus* em resíduos de casca de café robusta e a caracterização desta enzima. Em estudo anterior foi constatado que as melhores condições de cultivo são em 20°C, 87 rpm, pH 4,0, sem suplementação. Foi realizado um *screening* enzimático, revelando que o pico de produção de pectinase se dá ao sétimo dia. A amostra foi concentrada (1,54UI/mL) e foi realizada uma comparação entre a porção concentrada e o extrato bruto (0,43UI/mL). As melhores condições bioquímicas da pectinase para o pH se deram em faixas ácidas (pH 4-5) e básicas (pH 9-10), a melhor temperatura 60°C, foi ativado pelos compostos fenólicos ácido transferúlico e ácido tânico, íons de Mn^{2+} , Ca^{2+} e pelo EDTA. A pectinase se mostrou estável quanto a termoestabilidade até o período de 72 horas nas temperaturas de 30, 60 e 80°C no extrato bruto e também na fração concentrada em 30 e 60°C. O teste de hidrólise demonstrou capacidade de degradação do substrato lignocelulósico pela pectinase, se mantendo até o período final de 24 horas do teste, sendo que não houve nenhuma atividade pectinolítica quando ao teste utilizando a casca de café pré-tratada. Os resultados do presente trabalho demonstraram o potencial de produção de pectinase pelo *Paecilomyces formosus*, sendo caracterizada, contribuindo com novas informações dentro do cenário biotecnológico, se fazendo necessário mais pesquisas.

Palavras chave: *Paecilomyces formosus*, pectinase, caracterização, enzimas.

Abstract

Brazil stands out as the world's largest coffee producer, more than 50 million bags of coffee are produced annually, after coffee processing there is waste generation (husk, pulp, mucilage) in the same proportion, reaching up to 50% of total production. In this work, the potential for pectinase enzyme production by *Paecilomyces formosus* in Robusta coffee husk residues and the characterization of this enzyme were investigated. In a previous study, it was found that the best cultivation conditions are at 20°C, 87 rpm, pH 4.0, without supplementation. An enzymatic screening was carried out, revealing that the peak of pectinase production occurs on the seventh day. The sample was concentrated (1.54UI/mL) and a comparison was made between the concentrated portion and the crude extract (0.43UI/mL). The best biochemical conditions for pectinase for pH occurred in acid (pH 4-5) and basic (pH 9-10) ranges, the best temperature was 60°C, it was activated by the phenolic compounds transferulic acid and tannic acid, Mn²⁺ and Ca²⁺ ions and EDTA. Pectinase was stable in terms of thermostability for up to 72 hours at temperatures of 30, 60 and 80°C in the crude extract and in the concentrated fraction at 30 and 60°C. The hydrolysis test demonstrated the ability to degrade the lignocellulosic substrate by pectinase, which was maintained until the final 24-hour period of the test, and there was no pectinolytic activity when using pre-treated coffee husks. The results of the present work demonstrated the potential of pectinase production by *Paecilomyces formosus*, being characterized, contributing with new information within the biotechnological scenario, making further research necessary.

Keywords: *Paecilomyces formosus*, pectinase, characterization, enzymes.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	14
2 Revisão bibliográfica.....	15
2.1 Café.....	15
2.2 Parede celular vegetal.....	18
2.2.1 Celulose.....	19
2.2.2 Hemicelulose.....	20
2.2.3 Lignina.....	23
2.2.4 Pectina.....	23
2.3 Pré-tratamento.....	25
2.4 <i>Paecilomyces formosus</i>	26
3 Justificativas.....	27
4 Objetivos.....	28
5 Materiais e métodos.....	28
5.1 Origem dos resíduos de café.....	28
5.2 Pré-tratamento.....	28
5.3 <i>Screening</i> enzimático da cepa 3RE22.....	28
5.4 Ensaio enzimático.....	29
5.5 Quantificação de proteína.....	30
5.6 Concentração de proteína.....	30
5.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.....	30
5.8 Coloração com nitrato de prata.....	31
5.9 Caracterização bioquímica da pectinase.....	31
5.9.1 Efeito do pH.....	31
5.9.2 Efeito da temperatura.....	31

5.9.3 Termoestabilidade.....	31
5.9.4 Efeito de íons metálicos.....	32
5.9.5 Efeito de compostos fenólicos.....	32
5.10 Hidrólise do substrato lignocelulósico.....	32
6 Resultados	32
6.1 <i>Screening</i> enzimático da cepa 3RE22.....	32
6.2 Concentração do extrato bruto.....	34
6.3 Caracterização bioquímica da pectinase.....	34
6.3.1 Efeito do pH.....	34
6.3.2 Efeito da temperatura.....	37
6.3.3 Efeito de compostos fenólicos.....	38
6.3.4 Efeito de íons e modificadores.....	39
6.3.5 Termoestabilidade.....	41
6.4 Hidrólise do substrato lignocelulósico.....	44
6.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.....	45
7 Conclusões.....	47
8 Perspectivas futuras.....	48
9. Referências bibliográficas.....	49

Lista de figuras

Figura 1: Estrutura esquematizada de um grão de café.....	16
Figura 2: Esquematização dos resíduos gerados no processo de beneficiamento do café..	17
Figura 3: Representação das características estruturais da parede celular vegetal primária.....	19
Figura 4: Representação esquemática da celulose.....	20
Figura 5: Representação esquemática da Xilana.....	22
Figura 6: Representação esquemática da Manana.....	23
Figura 7: Estrutura de alcoóis precursores da lignina.....	24
Figura 8: Representação esquemática da pectina.....	25
Figura 9: Perfil de indução enzimática de <i>P.formosus</i> 3RE22 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café robusta 1% (m/v).....	35
Figura 10: Caracterização do efeito do pH sobre as atividades enzimática da pectinase do extrato bruto de <i>P. formosus</i> crescido em casca de café robusta.....	37
Figura 11: Caracterização do efeito do pH sobre as atividades enzimática da pectinase da fração concentrada de <i>P. formosus</i> crescido em casca de café robusta.....	37
Figura 12: Caracterização do efeito da temperatura sobre as atividades enzimáticas da pectinase do extrato bruto concentrado de <i>P. formosus</i> em casca de café robusta.....	38
Figura 13: Efeito de compostos fenólicos sobre a atividade de pectinase no extrato bruto..	39
Figura 14: Efeito de compostos fenólicos sobre a atividade de pectinase no extrato bruto concentrado.....	40
Figura 15: Efeito de íons sobre a atividade de pectinase no extrato bruto.....	41
Figura 16: Efeito de íons sobre a atividade de pectinase no extrato bruto concentrado.....	42
Figura 17: Termoestabilidade da atividade de pectinase no extrato bruto e extrato bruto concentrado com 30°C.....	43
Figura 18: Termoestabilidade da atividade de pectinase no extrato bruto e extrato bruto concentrado com 60°C.....	44
Figura 19: Termoestabilidade da atividade de pectinase no extrato bruto e extrato bruto concentrado com 80°C.....	44
Figura 20: Hidrólise da casca de café robusta com e sem pré-tratamento.....	46

Figura 21: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% do extrato bruto e fração concentrada...47

Lista de tabelas

Tabela 1: Perfil pectinolítico de *P. formosus* no extrato bruto, concentrado e ultrafiltrado....35

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café. Na safra de 2022 foram produzidos 50,92 milhões de sacas de café beneficiadas de 60 kg, com área de produção de 1,84 milhões de hectares, em que 32,72 milhões de sacas são de café arábica e 18,19 milhões de sacas são de café robusta, com os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Bahia sendo seus principais produtores (EMBRAPA, 2022; CONAB, 2023).

Os grãos de café após a colheita podem ser processados de duas maneiras: via seca ou via úmida. Na via seca o grão é seco logo após a colheita em sua forma íntegra em um terreiro aberto ou com secador mecânico, gerando como resíduos, as cascas. Na via úmida após a colheita acontece a lavagem dos grãos, em tanques, que são separados de acordo com o estágio de maturação, passando por uma remoção da casca. Logo após, ocorre o processo de fermentação em tanques por até dois dias para remoção da mucilagem, resultando na obtenção de lotes de grãos mais homogêneos (DURÁN *et al.*, 2017).

Os cafeeiros utilizados atualmente para produção no Brasil são o café arábica e café conilon ou robusta, pertencentes as espécies *Coffea arabica* e *Coffea canephora* respectivamente. O café robusta em sua composição possui mais cafeína, menor acidez, menor quantidade de açúcar, maiores quantidades de sólidos solúveis e maior resistência à seca quando comparado ao café arábica, além de serem mais utilizados na produção de café instantâneo (PEREIRA *et al.*, 2020).

Anualmente na agroindústria brasileira de café (cultivo, colheita, processamento, torrefação e consumo), há a geração de aproximadamente 673,3 toneladas de resíduos (BERNI; MANDUCA, 2020). Os resíduos agroindustriais, também chamados de biomassa lignocelulolítica, provenientes da produção cafeeira possuem uma riqueza de compostos como carboidratos, incluindo a celulose, hemicelulose e pectina, além de lignina e proteínas entre outros compostos presentes na parede celular vegetal. Dessa forma, devido a constituição lignocelulósica desses resíduos agroindustriais está surgindo um interesse crescente no aproveitamento de resíduos de diversos plantios para utilização na indústria biotecnológica (DURÁN *et al.*, 2017).

A parede celular vegetal possui a capacidade de resistir a ataques físicos, químicos e enzimáticos, também chamada de recalcitrância. Em virtude dessa recalcitrância presente na biomassa, é necessária a utilização de um pré-tratamento para fracionar seus constituintes aumentando a área de contato e tornando-a mais acessível à hidrólise química ou enzimática (ANDRADE, 2020; PEIXOTO, 2019).

Um dos tipos de pré-tratamento hidrotérmico que utiliza água e pressão para se obter um substrato sujeito à hidrólise enzimática é o de água quente líquida (*Liquid Hot Water*).

Este processo é eficiente no rompimento da rígida estrutura da biomassa lignocelulolítica, resultando numa parte sólida rica em celulose e uma parte líquida rica em açúcares derivados da hemicelulose. Por não fazer uso de reagentes químicos, esse pré-tratamento possui valor ambiental e econômico, sendo fortemente recomendado a sua utilização no setor de biorefinaria (PEIXOTO, 2019).

O uso de microrganismos produtores de enzimas capazes de converter os substratos em bioprodutos, agrega valor econômico, além de ajudar na questão ambiental. As pectinases são um grupo de enzimas que catalisam a degradação de pectinas, sendo principalmente utilizadas na indústria alimentícia durante a produção de vinhos e sucos, diminuindo a viscosidade, o tempo de extração e filtração da polpa da fruta, além de auxiliar na despigmentação e clarificação do suco. Na indústria farmacêutica as pectinases podem ser utilizadas para redução do nível de colesterol no sangue e no tratamento de distúrbios gastrointestinais (SANTI, 2014). Na indústria cafeeira a pectinase é utilizada para acelerar a fermentação do café, facilitando a remoção da mucilagem do grão (UENOJO; PASTORE, 2007).

Há uma grande diversidade de microrganismos capazes de produzir enzimas pectinolíticas, como bactérias, fungos filamentosos, leveduras, protozoários e nematoides. Porém, pela sua grande produção e variedade de pectinases, os fungos filamentosos tem preferência para utilização em escala industrial (SANTI, 2014). Neste trabalho se põe em destaque a espécie *Paecilomyces formosus*, porém há outros fungos com grande potencial como *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma sp.*, *Neurospora crassa*, *Penicillium sp.* e *Fusarium sp.* (TARAFDAR,2021; NISHA, 2016).

O fungo *P. formosus*, que pode ser isolado de diferentes substratos como alimentos, plantas e solos, realiza a degradação de compostos lignocelulósicos através da produção de uma ampla gama de enzimas lignocelulolíticas, não produz micotoxina, é uma fonte produtora de metabólitos secundários de valor agregado para a bioindústria e biorrefinarias (LAGUNA, MARANTE, MIOSO, 2015). De acordo com o site da Food & Drug Administration (FDA) (2023) a espécie *Paecilomyces formosus* não consta como geralmente reconhecido como seguro (em inglês *Generally Recognized As Safe – GRAS*).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Café

O café globalmente é um dos principais alimentos comerciais agrícolas no mundo (PEREIRA *et al*, 2021; GAO *et al*, 2021; CASTRO *et al*, 2018). O Brasil se destaca como

maior produtor e exportador mundial A exportação brasileira nos primeiros 4 meses de 2023 foi de 11,2 milhões de sacas de café de 60 kg, já em 2022 foi de 39,8 milhões de sacas de 60 kg (CECAFE,2023; OIC, 2023; CONAB, 2023).

A fruta de café maduro, demonstrada na figura 1, também denominada cereja, consiste em uma camada externa, o pericarpo ou casca, que recobre a polpa ou mesocarpo, internamente à polpa está a mucilagem, substância gelatinosa composta de materiais pectináceos, açúcares, ácidos orgânicos e água, a próxima estrutura é o endocarpo ou pergaminho, seguido de uma fina camada prateada que envolve o grão, que por sua vez é constituído por duas sementes, sendo a semente o produto de interesse na produção do café (HOSEINI *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2021; PIMENTA *et al.*, 2018).

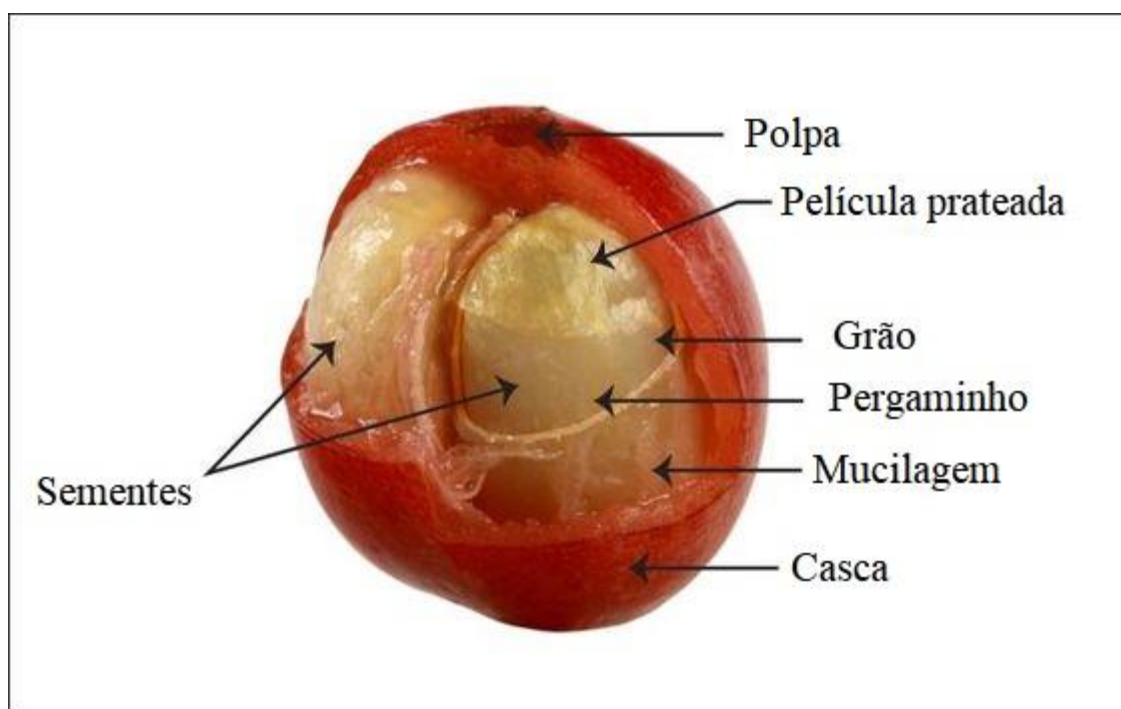


Figura 1: Estrutura esquematizada de um grão de café. Fonte: <https://www.cafesbernal.es/materia-prima-del-cafe/>

Para manutenção da qualidade das sementes, prevenindo prováveis patógenos, é realizada a extração das camadas da fruta do café, por se tratar de um processo industrial de beneficiamento que pode ser feito pelos métodos seco e úmido. A via seca é mais tradicional, simples e barata em comparação com a via úmida, produzindo menor quantidade de resíduos sólidos e líquidos e consiste na secagem dos grãos de café logo após a colheita, ao sol ou mecanicamente em fornos, a secagem termina quando o teor de umidade do grão alcançar aproximadamente 13%, logo após são utilizadas máquinas de descascamento para retirar as camadas externas do grão, gerando resíduos (casca) que geralmente são descartados, em seguida os grãos são torrados e ensacados. A via úmida

precisa da utilização de mais equipamentos e água, tornando-se mais caro em comparação com a via seca. Neste processo após a colheita, se faz a imersão das cerejas de café em água separando impurezas, cascas, frutos verdes e maduros. A seguir a casca e a polpa são retiradas mecanicamente por um despulpador, posteriormente os grãos são armazenados em tanques de fermentação de 12-48h para retirada da mucilagem, no qual microrganismos produtores de enzimas irão degradar a mucilagem aderida ao grão de café, seguidamente os grãos são retirados dos tanques de fermentação, lavados e secos (HOSEINI *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2021; PIMENTA *et al.*, 2018).

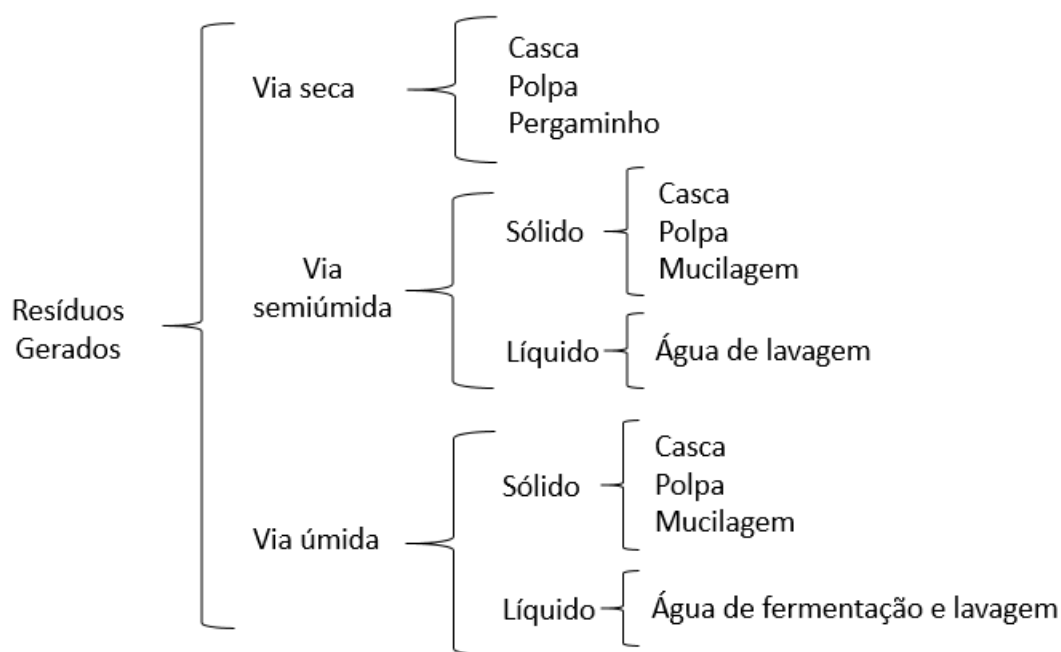


Figura 2: Esquemática dos resíduos gerados no processo de beneficiamento do café. Fonte: (DURÁN *et al.*, 2017)

Durante a produção agroindustrial, a casca, polpa, mucilagem, pergaminho, grãos imaturos e defeituosos se tornam resíduos tanto pela via úmida quanto pela via seca assim como está demonstrado na figura 2 (SANTOS, 2021; DURÁN *et al.*, 2017). Na via seca, a casca é o principal subproduto gerado, correspondendo a 45% do peso da cereja seca. Segundo Hoseini e colaboradores (2021), cada tonelada de cereja de café fresca produz 0,12–0,18 toneladas de cascas de café com o método seco e 0,5 toneladas de polpa de café com o método úmido, estes resíduos podem causar danos ao meio ambiente por possuírem em sua composição fatores antinutricionais como taninos e cafeína, além disso, caso os resíduos agroindustriais sejam dispostos diretamente em efluentes sem tratamento prévio, por sua alta concentração de matéria orgânica, pode prejudicar a vida aquática. Na composição destes resíduos agroindustriais há alto teor de carboidratos, proteínas e

minerais que são excelentes substratos para crescimento de fungos, bactérias e outros microrganismos (HOSEINI *et al.*, 2021; DUONG *et al.*, 2020; SINGH; SHARMA, 2020; KLINGEL *et al.*, 2020).

Durán e colaboradores (2017) descreveram que na composição do grão o teor de carboidratos solúveis é de 6 – 12,5 %, constituído por monossacarídeos (frutose, glicose, galactose, arabinose), oligossacarídeos (sacarose, rafinose, estaquiose) e polissacarídeos (polímeros de galactose, manose e arabinose). As cascas do café são resíduos gerados pela via seca, compostas pelo material lignocelulósico, incluindo a celulose (24,5%), hemicelulose (29,7%), lignina (23,7%) e pectina (1 – 3%). A polpa, gerada na via úmida, possui em sua composição material lignocelulósico abrangendo a celulose (60,5-65,5%), hemicelulose (1,3-3,3%), pectina (6,5%) e outros compostos como tanino (3%) e cafeína (1,5%) (HOSEINI *et al.*, 2021; SINGH; SHARMA, 2020; KLINGEL *et al.*, 2020; HEJNA, 2021).

2.2 Parede celular vegetal

A parede celular vegetal é uma estrutura complexa e dinâmica, associada aos diversos processos do ciclo de vida das plantas. Funciona como uma barreira física contra forças bióticas e abióticas, protege a célula vegetal prevenindo a entrada de patógenos, define o formato das células, regula a pressão hidrostática interna, e é responsável pela morfogênese da planta como um todo (LESZCZUK *et al.*, 2023; OELMÜLLER *et al.*, 2023; ZHANG *et al.*, 2021; HOUSTON *et al.*, 2016; VOINICIUC *et al.*, 2018). É constituída por microfibrilas de celulose (várias cadeias de celulose agrupadas lateralmente por ligações de hidrogênio) envolvidas em uma rede de polissacarídeos de hemicelulose, pectina, lignina, proteínas e minerais. (LESZCZUK *et al.*, 2023; GHARECHAH I *et al.*, 2023; VOINICIUC *et al.*, 2018). A parede celular possui em média 15-40% de celulose, 30-40% hemicelulose e aproximadamente 20% de lignina, podendo variar de acordo com a espécie, estágio de crescimento e o tipo de tecido celular (GHARECHAH I *et al.*, 2023).

A célula vegetal possui dois tipos de paredes celulares complexas ao seu redor, as chamadas parede primária e parede secundária. A parede primária é encontrada em células jovens em crescimento, fornece flexibilidade e suporte para a estrutura interna da célula, intervindo na relação célula-célula, em sua composição possui celulose, hemicelulose e pectina. A parede secundária é uma estrutura mais rígida, espessa e durável, situada entre a parede primária e a membrana plasmática, é depositada após o crescimento da célula, possui em sua composição celulose, hemicelulose, uma pequena quantidade de pectina e um alto teor de lignina o que confere recalcitrância do conteúdo celular a processos

químicos e biológicos (HOUSTON *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2021; COSGROVE *et al.*, 2017; RAO *et al.*, 2023).

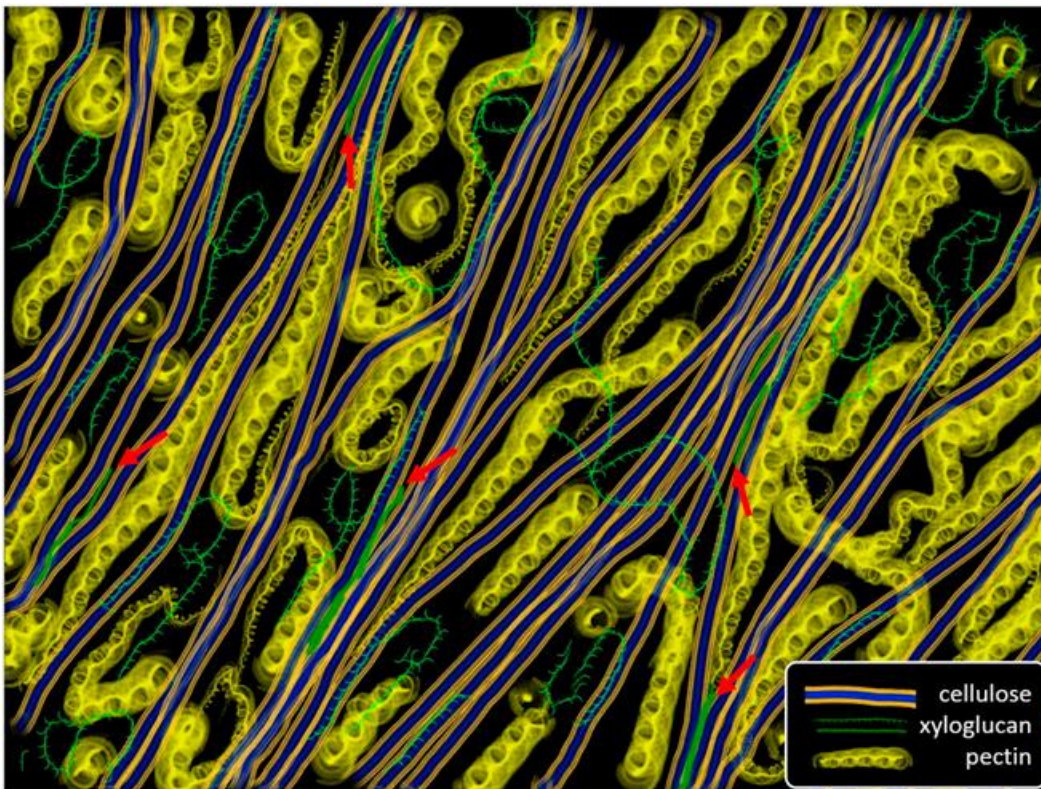


Figura 3: Representação das características estruturais da parede celular vegetal primária. Fonte: COSGROVE *et al.*, 2017

2.2.1 Celulose

Celulose é um polímero de unidades de glicose unidas por ligações β -1,4. A organização da celulose na parede celular vegetal se dá pelas microfibrilas, polímeros de celulose linear agrupados por ligações inter e intramoleculares de hidrogênio, podem ser classificadas como cristalina ou amorfa de acordo com o grau de polimerização das microfibrilas (KOTULA *et al.*, 2022; GHARECHAHI *et al.*, 2023; YADAV *et al.*, 2023; SHUKLA *et al.*, 2023). Celulose cristalina é insolúvel, recalcitrante e altamente resistente a hidrólise, porém em certas partes as ligações de glicose são mais fracas, menos organizadas, as tornando mais susceptíveis a degradação, as caracterizando como a porção amorfa, sendo que o grau de polimerização está inversamente relacionado com a hidrólise da celulose. (BANERJEE *et al.*, 2023).

Celulases são referidas como todas as enzimas capazes de clivar as ligações β -1,4 da celulose, podendo ser classificadas em três tipos de acordo com porção de atuação (KORSA *et al.*, 2023). As endoglicanases ou endocelulases quebram as ligações glicosídicas em locais aleatórios na região amorfa, se ligando a componentes não

cristalinos, ocorrendo a hidrólise devido as ligações de hidrogênio serem mais fracas. As exocelulases ou celobiohidrolases clivam as microfibrilas pelas suas extremidades, liberando dissacarídeos como a celobiose e glicose. As β -glicosidases ou celobiasas quebram as ligações β -1,4 de glicose consecutivas liberando monômeros de glicose pela hidrólise da celobiose e de outros oligômeros da celobiose. (KORSA *et al.*, 2023; ABUAJAH *et al.* 2022). BERISIO *et al.* 2022; GHARECHAH *et al.*, 2023)

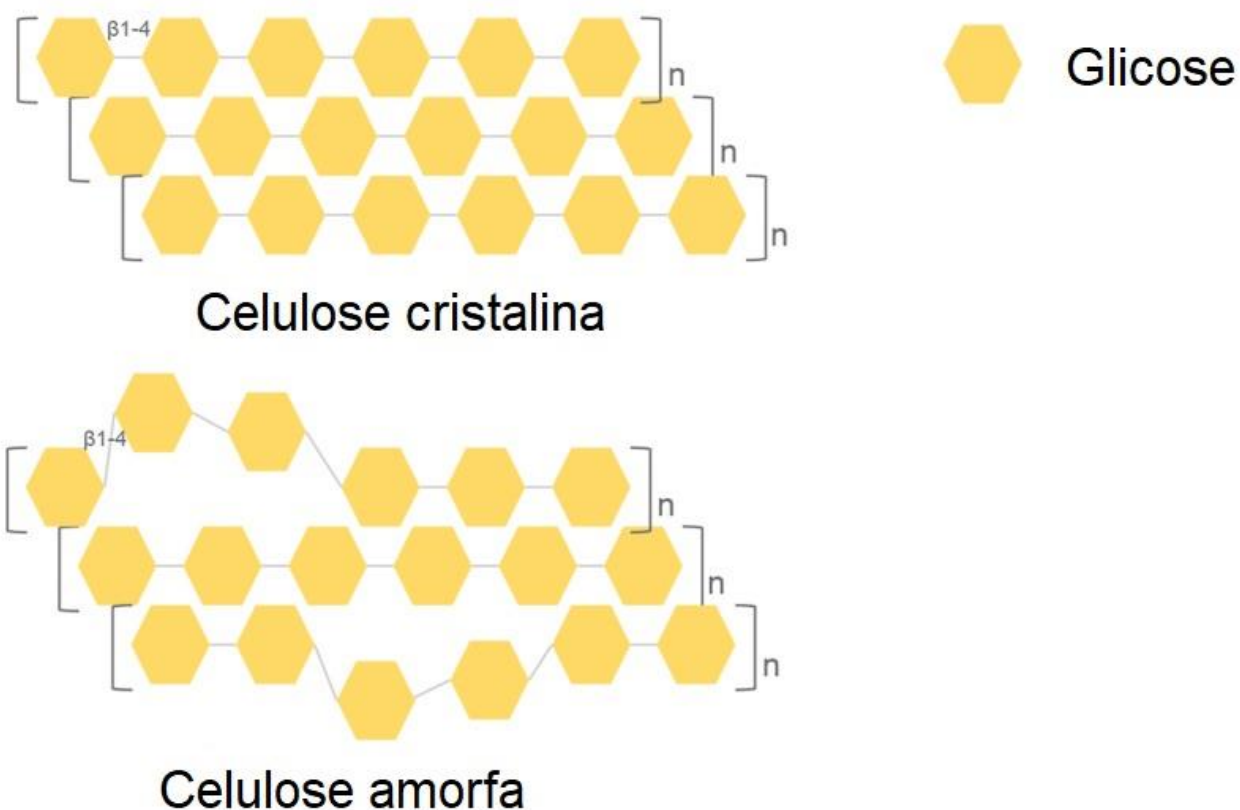


Figura 4: Representação esquemática da celulose. Extraído e modificado de Gharechahi *et al.* (2023).

2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose não é um único polissacarídeo, mas um grupo de polissacarídeos heterógenos, o esqueleto da cadeia principal contém resíduos de açúcares como a xilana, manana e glucana e as ramificações são compostas por pentoses (L-arabinose, D-xilose), hexoses (D-manose, L-galactose, L-rhamnose, L-fucose) e ácidos de açúcares (ácido-D-galacturônico e ácido 4-O-metil-glucurônico) (YADAV *et al.*, 2023; SHUKLA *et al.*, 2023). Hemicelulose é a segunda maior fração polissacarídica da parede celular vegetal, logo após a celulose, constituindo de 15-35% da matéria seca das plantas anuais e perenes. O tipo de hemicelulose presente em cada espécie de planta varia de acordo com o tipo de célula, localização e estágio de desenvolvimento (RAO *et al.*, 2023).

Xilana é o polissacarídeo de hemicelulose mais abundante, na cadeia principal é composta por resíduos de D-xilose associadas por ligações β -1,4. Os resíduos de xilose podem se associar a diferentes combinações de grupos funcionais como a arabinose, galactose, glicose, ácido galacturônico, ácido metilglucurônico e até mesmo a própria xilose. De acordo com a sua estrutura e os grupos funcionais ligados a cadeia primária, as xilanas podem ser classificadas em glicuronoxilanas, arabinoxilanas, glicuroarabinoxilanas e arabinoglicuroxilana (GHARECHAH *et al.*, 2023; CURRY *et al.*, 2023; HSIEH & Harris, 2019).

As enzimas que atuam sobre a cadeia de xilana e seus grupos funcionais são comumente designadas como xilanases, são importantes para microrganismos, podendo ser patógenos ou não, auxiliando na degradação da parede celular vegetal e contribuindo para a ciclagem do carbono. Essas enzimas são classificadas de acordo com o local de atuação, as 1,4- β -xilanases quebram a ligação β -1,4 da cadeia principal da xilana em pontos aleatórios disponibilizando xilooligômeros. As 1,4- β -xilosidases é atribuído o papel de catalizar a hidrólise desses xilooligômeros em xilose. As cadeias laterais de arabinose são removidas pelas α -arabinofuranosidas, enquanto as α -d-glicuronisades atuam sobre o ácido metilglucurônico (MENDONÇA *et al.*, 2023; KHAMASSI; DUMON, 2023).

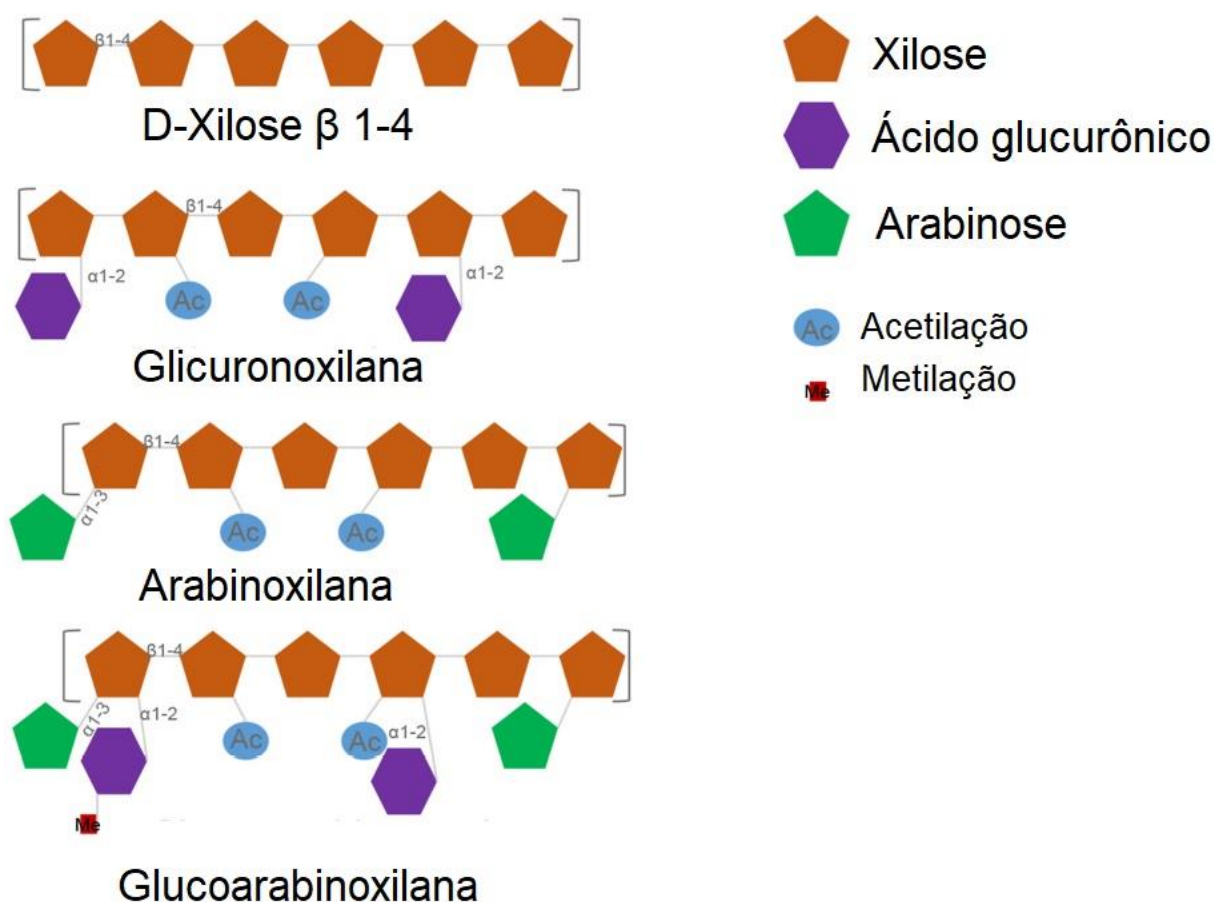


Figura 5: Representação esquemática da Xilana. Extraído e modificado de Gharechahi *et al.* (2023).

As mananas são outros polissacarídeos prevalentes do grupo das hemiceluloses, sua cadeia principal é composta por resíduos de D-manose unidas por ligações β -1,4. A manana pode ter ramificações de galactose formando as galactomananas, as galactoglicomananas e as glicomananas possuem na cadeia principal resíduos de D-manose e D-glicose, podendo ter ramificações de galactose ou não (GHARECHAH *et al.*, 2023).

As enzimas atribuídas para a quebra dos polímeros de manana são designadas como mananases. A endo- β -mananase auxilia na hidrólise das ligações β -1,4 internas da cadeia principal, resultando em manooligômeros, já estes sofrem a ação da β -manosidase removendo os resíduos de manose. As galactoglicomananas e glicomananas sofrem a ação de enzimas características como a β -glicosidase e α -galactosidase (ZHANG *et al.*, 2021; OELMÜLLER *et al.*, 2023; RAO *et al.*, 2023; PANWAR *et al.*, 2023).

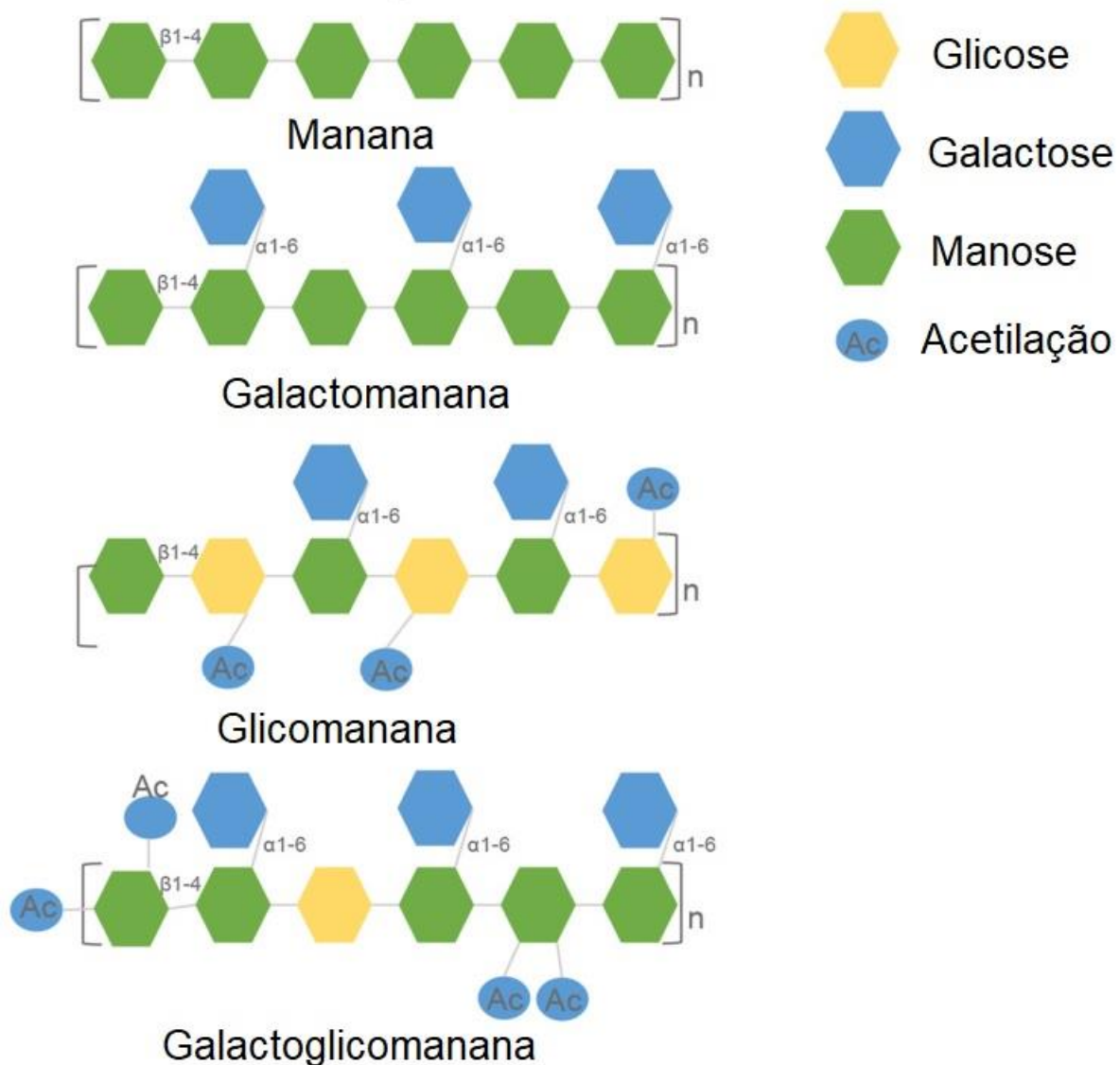


Figura 6: Representação esquemática da Manana. Extraído e modificado de Gharechahi *et al.* (2023).

2.2.3 Lignina

A lignina é a segunda macromolécula mais abundante na natureza, logo após a celulose, sua estrutura molecular é grande e complexa, formada por moléculas aromáticas e sobretudo por três tipos de monômeros: p-coumarina, álcool sinapílico e coniferil. Está presente na parede celular vegetal secundária, atribui rigidez, é insolúvel em água, é altamente interligada a celulose e hemicelulose agindo como um adesivo entre elas a tornando mais resistente a hidrólise enzimática, forma uma barreira física contra-ataque de patógenos e aumenta a recalcitrância (SHUKLA *et al.*, 2023; GHARECHAHÍ *et al.*, 2023; BARROS *et al.*, 2016; VANHOLME *et al.*, 2019). A complexidade do metabolismo da lignina se dá pela sua heterogeneidade, foram descobertos até hoje trinta e cinco monômeros de lignina naturais, dificultando a sua degradação por enzimas específicas (ZHANG *et al.*, 2021).

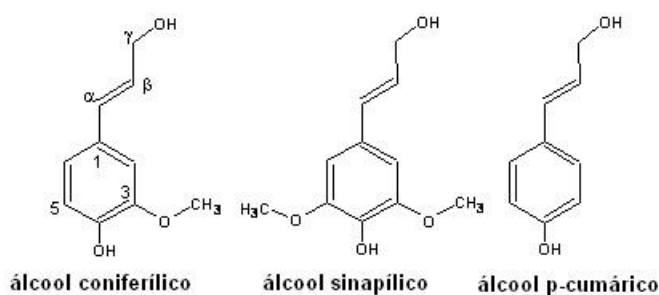


Figura 7: Estrutura de alcoóis precursores da lignina. Fonte: Pitarello (2007).

2.2.4 Pectina

A pectina é um complexo de polissacarídeos essencial para a parede celular vegetal, são mais abundantes na lamela média (camada gelatinosa entre as paredes primárias de duas células vegetais conjuntas) e na parede primária.

Segundo Xiao e colaboradores (2021), a pectina possui uma estrutura composta por unidades de ácido D-galacturônico unidas via ligação glicosídica do tipo α -1,4 abrangendo três domínios diferentes denominados homogalacturanas, ramnogalacturanas I, ramnogalacturanas II (TINGLEY *et al.*, 2021). As homogalacturanas são definidas como cadeias de ácido galacturônico unidas por ligação glicosídica do tipo α -1,4 lineares, podendo ser metil-esterificados ou acetilados. Ramnogalacturanas I são unidades de ácido D-galacturônico unidas via ligação glicosídica do tipo α -1,4, que são interrompidas aleatoriamente por resíduos de L-rhamnose com cadeias laterais de D-galactose e L-arabinose. A ramnogalacturanas-II é um dos polissacarídeos mais complexos, consistindo em uma cadeia de homogalacturana com ramificações de 11 a 12 diferentes açúcares. (VOINICIUC *et al.*, 2018; OELMÜLLER *et al.*, 2023) (GHARECHARI *et al.*, 2023)

Baseando-se na sua composição, as pectinas são classificadas em quatro grupos: protopectina, ácido pécico, ácido pectínico e pectina (FRANÇA, 2018).

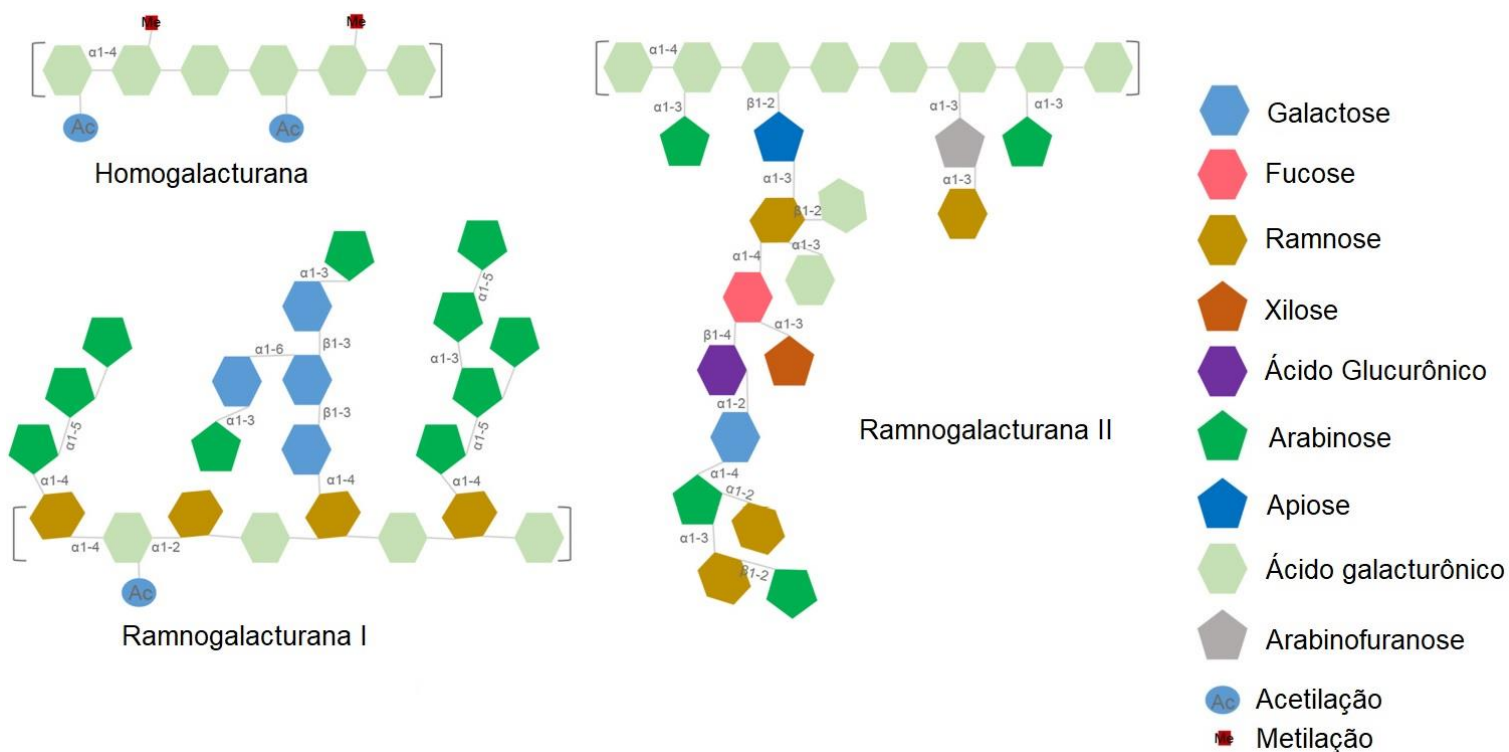


Figura 8: Representação esquemática da pectina. Extraído e modificado de Gharechahi *et al.* (2023).

Devido a abundância de substâncias pécicas, as enzimas que agem sobre elas são classificadas de acordo com o seu mecanismo de ação e nomeadas em 3 grupos: as protopectinases, que solubilizam a protopectina liberando pectina solúvel; pectina esterase que catalisa a desesterificação do grupo metoxil da pectina, formando ácido pectínico e metanol; enzimas despolimerizantes que a partir do mecanismo de quebra das ligações glicosídicas são classificadas como hidrolases (poligalacturanase) e liases (pectina liase e pectato liase) (FRANÇA, 2018; PEDROLLI *et al.*, 2009; SUDEEP KC *et al.*, 2020)

As pectinases são utilizadas na indústria para produção de sucos e vinhos diminuindo a sua viscosidade, na fermentação do café para retirada da mucilagem, na produção de alimentos processados, na indústria têxtil, na indústria farmacêutica, na produção de papel, além de ser aplicada também em associação com outras enzimas (celulases, hemicelulases e proteases) na degradação da parede celular de plantas para extração de óleos vegetais (óleo de amêndoa, sementes de girassol, sementes de oliva) (SANTI, 2014; PEIXOTO, 2019; FRANÇA, 2018; AGUIAR, FERREIRA-NOZAWA, 2020). Tarafdar e colaboradores (2021) relataram que o mercado industrial de enzimas é de aproximadamente US\$ 4,5 bilhões, com expectativas de aumento para US\$ 7 bilhões em 2021. Segundo o site Market Research Store (2019), o mercado industrial de pectinase em

2014 foi de 27,6 milhões, ocorrendo aumento nos últimos quatro anos, subindo para US\$ 30,04 milhões em 2019, com perspectivas de se alcançar US\$ 35,5 milhões em 2024.

O acesso a pectina é dificultado pela recalcitrância da parede celular vegetal presente na biomassa lignocelulolítica, fazendo-se necessário a utilização de um pré-tratamento para redução do tamanho dessas partículas, nesse processo ocorre a quebra da estrutura polimérica da parede celular da biomassa, solubilizando seus componentes e aumentando a superfície de contato, no qual microrganismos vão utilizar os produtos do pré-tratamento para produção de enzimas (pectinases, celulasas e hemicelulasas) e compostos de interesse comercial (ZHUANG *et al.*, 2017; ZIELIŃSKI *et al.*, 2019; KANG *et al.*, 2020).

2.3 Pré-tratamento

Os pré-tratamentos são processos utilizados para romper a interconexão dos componentes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose, pectina, lignina), redução do tamanho das partículas da biomassa, da cristalinidade da celulose e também quebrar a ligação entre hemicelulose e a lignina, aumentando a disponibilidade desses polissacarídeos para a conversão em produtos de interesse (biocombustível, energia, biogás e enzimas). A sua eficiência é baseada no rendimento da hidrólise antes e depois do pré-tratamento, baixa perda ou degradação de carboidratos, baixa ou não geração de compostos tóxicos e consumir pouca energia (HALDER *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2022).

Diversos métodos de pré-tratamento foram e são desenvolvidos, utilizando estratégias diferentes, cada um afetando componentes diferentes da biomassa lignocelulolítica, de acordo com as moléculas de interesse. São classificados como físicos, químicos, físico-químicos e biológicos.

Pré-tratamentos físicos envolvem a energia mecânica, utilizando técnicas moagem, trituração, pirolise, extrusão e processos mecânicos quebrando a barreira de lignina, disponibilizando os açúcares da parede celular. Este método tem como objetivo reduzir mecânicamente o tamanho da biomassa, área de superfície e cristalinidade. É um processo que utiliza variação de temperatura e pressão simultaneamente, exigindo grande consumo de energia, resultando em uma produção de alto custo (DEVI *et al.*, 2021; CAO *et al.*, 2023; SHUKLA *et al.*, 2023; BANERJEE *et al.*, 2023).

O pré-tratamento químico é mais utilizado para a remoção parcial ou total de componentes da biomassa lignocelulolítica, se baseando no uso de produtos químicos, transformando a estrutura cristalina em uma forma amorfa, quebram as ligações de hidrogênio e as ligações covalentes entre a celulose, hemicelulose e lignina, além de

separar a lignina dos outros compostos. Este método envolve a utilização de diversos agentes químicos, como ácidos, bases, amônia, peróxido, ozônio, e soluções iônicas (HAZEENA *et al.*, 2020).

O pré-tratamento físico-químico é a combinação de duas técnicas, combinando o pré-tratamento físico e o químico. São estratégias que combinam mudanças de temperatura, pH, e pressão, sendo usados em processos como explosão de vapor, *liquid hot water*, explosão de fibras de amônio, explosão de CO₂ e oxidação com ar úmido. Estes processos auxiliam na dissolução de polímeros de hemicelulose e celulose, aumentando os açúcares disponíveis e na remoção da lignina. São processos considerados como ecológicos pela baixa utilização de produtos químicos, onde a água participa como principal solvente. (SHUKLA *et al.*, 2023; CHEN *et al.*, 2022).

O pré-tratamento biológico é um dos métodos mais utilizados devido ao baixo custo de energia, baixa geração de poluente, são ecológicos, devido não utilizar produtos químicos, contando com uma diversa gama de microrganismos (bactérias, fungos) utilizados para o processo, secretando enzimas celulolíticas, aumentando o acesso a celulose e aos compostos da hemicelulose para hidrólise (YADAV *et al.*, 2023).

Dos diferentes tipos de pré-tratamentos (físico, químico, físico-químico e biológico) o *Liquid Hot Water* (LHW) é um pré-tratamento físico-químico eficiente para degradação de biomassa lignocelulósica, por não utilizar produtos químicos, somente água como único solvente. A água neste processo é exposta a altas temperaturas e alta pressão, permanecendo em estado líquido. Dessa forma, ocorre liberação de íons de hidrogênios da água, que auxiliam na penetração da parede celular vegetal, solubilizando seus componentes como a hemicelulose, lignina e pectina, os expondo à ação enzimática. Como consequência desse processo, ocorre o estabelecimento de uma concentração de açúcares fermentescíveis maior na parcela líquida (licor), criando um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos (YANG *et al.*, 2019; ZHUANG *et al.*, 2017; KANG *et al.*, 2020; SERNA-LOAIZA *et al.*, 2021). A maior vantagem do pré-tratamento *Liquid Hot Water* sobre os outros pré-tratamentos é o fato de não utilizar reagentes químicos, evitando assim a formação de resíduos tóxicos, impedindo problemas de corrosão, diminuindo custos com manutenção, além de utilizar água como principal componente, deste modo se fazendo um processo mais ecológico.

2.4 *Paecilomyces formosus*

O gênero *Paecilomyces* comporta diversos fungos cosmopolitas, podendo ser saprófitas e patogênicos encontrados em diversos habitats, incluindo solos, alimentos e

plantas em decomposição, insetos, nematódeos e sedimentos marinhos. São termotolerantes, possuem grande potencial de esporulação, rápido crescimento em vários substratos e em baixas concentrações de oxigênio (Baazeem *et al.*, 2021)

Em 1907 o gênero *Paecilomyces* foi descrito primeiramente, por Bainier, como um gênero com apenas uma espécie, *P. Variotii* e um gênero próximo ao *Penicillium*. Após ser realizada uma revisão por Brown & Smith, e Samson, foram definidas 31 espécies, sendo elas relacionadas a dois gêneros de fungo: *Cordyceps* e *Torrubiella*. Em estudos posteriores por Luangsa-ard e Hywel-Jones foram realizadas análises filogenéticas utilizando dados da sequência de rDNA 18S, demonstrando que *Paecilomyces* é um grupo polifético, pertencendo a subclasse Sordariomycetidae e *Eurotiomycetidae* e indicando suas diferenças morfológicas. (MORENO-GAVÍRA *et al.*, 2020).

O fungo *P. formosus* participa do complexo de espécies do grupo *P. variotii*. Conforme sua taxonomia é classificado na filo *Ascomycota*, subfilo *Pezizomycotina*, classe *Eurotiomycetes*, subclasse *Eurotiomycetidae*, ordem Eurotiales, família *Thermoascaceae* (NCBI, 2023). Em virtude do rápido crescimento, condições de cultivo e fácil manuseio os fungos filamentosos são alvos de diversas pesquisas, com um grande potencial industrial para produção em larga escala de enzimas. *Paecilomyces formosus* recebeu atenção especial por ser fonte de metabólitos secundários, não produzir micotoxinas e por produzir uma ampla variedade de enzimas como amilases, quitinases, pectinases, fitases, tanases e xilanases, além de conseguir crescer e se desenvolver em resíduos agroindustriais, degradando parte da biomassa lignocelulolítica auxiliando no aproveitamento de recursos renováveis (LAGUNA, MARANTE, MIOSO, 2015; BRULE *et al.*, 2020; URQUHART *et al.*, 2018).

3 Justificativas

Todo o processo de produção do café, desde a colheita até o consumo, produz uma grande quantidade de resíduos. A composição química destes resíduos os torna proveitosos para o crescimento do fungo *Paecilomyces formosus* e produção de diversas enzimas de interesse biotecnológico.

O presente trabalho busca a produção e caracterização de enzimas pectinolíticas, em virtude da grande quantidade de pectina encontrada nas cascas do café robusta pelo método de beneficiamento seco. O pré-tratamento *Liquid Hot Water* foi utilizado para extração de licores abundantes em pectina da casca do café robusta, reutilizando o resíduo líquido do pré-tratamento para produção dessas enzimas.

4 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral a produção de enzimas pectinolíticas a partir dos resíduos gerados pelos métodos de beneficiamento do café robusta (casca) quando submetido à fermentação submersa utilizando licores obtidos a partir do pré-tratamento *Liquid Hot Water* nestes resíduos e a caracterização bioquímica da pectinase quanto ao efeito do pH, temperatura, termoestabilidade, efeito de íons, compostos fenólicos e álcool sobre sua atividade enzimática.

5 Materiais e métodos

5.1 Origem dos resíduos de café

As cascas de café robusta utilizadas no *screening* microbiológico foram doados pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência técnica e Extensão Rural (INCAPER) localizado na cidade de Vitória – ES, sendo armazenadas em temperatura ambiente e submetidas à moagem para redução da granulometria, se adequando ao processo de fermentação submersa.

5.2 Pré-tratamento

As cascas de café robusta triturada foram incubadas com água destilada, em cilindros de aço inoxidável, vedáveis, de volume interno de 300 mL (Swagelok, Ohio, EUA) na concentração de 1% m/m, temperatura 140°C e tempo de incubação de 6 minutos.

Os cilindros vedados contendo a mistura de biomassa e água foram aquecidos até a temperatura indicada e o tempo especificado em um banho de areia fluidizado Tecam SBL-2 (Cole Parmer; Vernom Hils, IL, EUA) capaz de atingir altas temperaturas com precisão de $\pm 2^\circ\text{C}$.

Após a incubação da biomassa, os cilindros foram resfriados em uma mistura de água gelada e gelo por aproximadamente 10 minutos. A fração líquida (licor) foi separada do sedimento por filtração a vácuo utilizando-se funil de Büchner e papel-filtro (Whatmann nº 5) sendo armazenada a -20°C até o momento de utilização, para cultivo e análise de composição.

5.3 *Screening* enzimático da cepa 3RE22

A micoteca do Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, possui nove cepas de *P. formosus* isoladas de diversos

ambientes, como solos do cerrado (campo sujo, cerradão floresta e cerrado *stricto sensu*), serrapilheiras e troncos de árvores do Distrito Federal.

A cepa 3RE22 foi selecionada por sua grande produção de pectinase em café robusta quando comparada às outras sete testadas por Andrade (2020). A sua utilização foi autorizada com a concessão de acesso e remessa de amostra de componente do patrimônio genético nº 010237/2015-1/CNPq, sendo que a micoteca possui registro nº 1128 no *World Data Center for Microorganism* (WDCM).

O isolado foi crescido em placas de petri, contendo meio MYG 2% (extrato de Malte Agar), durante 7 – 10 dias à 28°C em incubadora do tipo BOD (Demanda bioquímica de oxigênio) programada com fotoperíodo de 12 horas.

Para a indução da produção enzimática (curva de indução enzimática), a cepa fúngica foi crescida sob fermentação submersa utilizando o licor da casca de café robusta como substrato. Em Erlenmeyers de 2 litros, contendo 400 mL do licor, foram inoculadas suspensões de esporos, das placas de petri, com uma concentração de $2,5 \times 10^7$ esporos/mL, na proporção de 1% do volume total (4mL), durante 10 dias, sob agitação de 87 rotações por minuto (rpm), temperatura de 20°C e pH 4,0. Após este período, os cultivos foram filtrados a vácuo com auxílio de papel-filtro Whatman nº 5, e o material filtrado (extrato bruto) foi preservado em câmara fria a 4°C, acrescido de azida sódica 0,2%. A cada dia durante o cultivo, foi retirada uma alíquota de 1 % do volume final, devidamente congelada, para posterior determinação das atividades enzimáticas (carboximetilcelulase (CMCase), xilanases, mananases, pectinases) correspondente aquele dia.

5.4 Ensaio enzimático

A atividade enzimática foi definida quanto às atividades de carboximetilcelulases (CMCase), xilanases, mananases e pectinases. Os ensaios para detecção das atividades enzimáticas foram realizados em microescala, utilizando-se uma alíquota de 5 µL de extrato bruto e 10 µL dos substratos: carboximetilcelulose (CMC) 4%, xilana de farelo de aveia 1% (*oat spelts*), galactomanana 1%, pectina cítrica 1% (SIGMA).

Os ensaios foram conduzidos a 50°C, por 10 minutos, em microplacas de PCR incubadas em termociclador (BioRad). A determinação de açúcares redutores foi executada segundo o método do ácido dinitrosalicílico (DNS), descrito por Miller (1959), com a adição de 30µL de DNS à reação que foi submetida à fervura a 97°C por 10 minutos. A concentração de açúcares redutores liberados foi determinada a partir de leitura a 540nm em leitor de microplacas SPECTRAMAX (Molecular Devices, EUA). As atividades enzimáticas foram expressas em UI/mL, sendo que UI representa a quantidade de enzimas

capaz de liberar 1 μmol de produto por minuto nas condições de ensaio. Curvas de calibração foram realizadas utilizando-se os monossacarídeos (glicose, xilose, manose e ácido galacturônico) como padrões para os cálculos das atividades de CMCase, xilanase, mananase e pectinase, respectivamente.

5.5 Quantificação de proteína

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), empregando-se o Kit Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, EUA), utilizando solução BSA (albumina sérica bovina) para construção da curva padrão. Os ensaios foram realizados em microplacas de PCR, foram colocados 150 μL da amostra e 150 μL do reagente Bradford, após 5 minutos foram lidas a 595 nm em espectrofotômetro e calculadas, sendo expressas em U./mg de proteína total.

5.6 Concentração e Purificação parcial

O extrato bruto enzimático teve seu volume concentrado 10 vezes por meio do processo de ultrafiltração (Ex.: De 500mL foram obtidos 50mL de extrato bruto concentrado e 450mL de extrato bruto filtrado), utilizando uma membrana com retenção de 30 kDa no sistema Amicon Filtration System-Stirred Cells (Amicon Millipore Co., Bedford, MA, USA), com pressão de 75 psi, em ar comprimido, a 4°C. As alíquotas do concentrado e do ultrafiltrado foram armazenadas a 4°C para posterior avaliação do perfil holocelulolítico.

5.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

Amostras do extrato bruto e concentrado foram analisados por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). As amostras foram precipitadas em 80% de acetona, 20 % de NaCl 100 mM e sendo incubadas *overnight*. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 16.000 x G por 20 min, a 4°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas por três vezes em acetona PA refrigerada, e foram centrifugadas conforme mencionado anteriormente. As amostras permaneceram à temperatura ambiente para secagem em capela exaustora (CROWELL; WALL; DOUCETTE, 2013).

Após esse período, as amostras foram ressuspensas em 20 μL de tampão de amostra (tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 2%; azul de bromofenol 0,05%, glicerol 20% e β -mercaptoetanol 5%), fervidas por 5 min e aplicadas no gel de poliacrilamida 12%.

A eletroforese foi realizada em sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) contendo SDS 0,1% (v/v). Para cada corrida, serão utilizados 3 μL de marcador de massas moleculares LMW, contendo: fosforilase b (97,0

kDa), soroalbumina bovina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa) e inibidor de tripsina (20 kDa). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% (v/v), pH 8,3), à temperatura ambiente, e submetida a 25 mA constantes por 60 min. A concentração da amostra foi definida a partir dos resultados obtidos.

5.8 Coloração com nitrato de prata

Após a corrida eletroforética as bandas proteicas foram coradas pelo método de nitrato de prata (BLUM et al., 1987). Primeiramente, o gel foi incubado por 1 h em solução fixadora (metanol 40% e ácido acético 7%). Após a incubação, o gel foi lavado por 20 minutos em solução de etanol 50% (v/v). Este processo se repetiu por mais duas vezes. Em seguida, o gel foi incubado por 1 min em solução de tiosulfato de sódio 0,02% (m/v), lavado em água, e incubado na solução de coloração (nitrato de prata 0,2% m/v, formaldeído 0,03% v/v) por 15 min. Por fim, o gel foi lavado três vezes em água destilada e submetido à solução reveladora (carbonato de sódio 6,0% m/v, tiosulfato de sódio 0,004% v/v, formaldeído 0,02% v/v). Após o surgimento das bandas, a reação foi interrompida com solução fixadora e foi foto-documentado em scanner comercial.

5.10 Caracterização bioquímica da pectinase

5.10.1 Efeito do pH

Para determinação do efeito do pH na atividade pectinolítica, as amostras do extrato bruto e fração concentrada foram avaliadas na presença de tampões citrato, fosfato de sódio e glicina 50 mM de diferentes valores de pH nos intervalos de 2.0 - 5.0; 5.0 - 8.0; 8.0 - 12.0 respectivamente. O efeito do pH foi determinado através do ensaio enzimático alterando-se o protocolo do item 5.4: foi mantida a quantidade de enzima das amostras (5 µL), porém se dobrou a concentração do substrato (5 µL de pectina cítrica 2%) e foram adicionados 5 µL ao tampão concentrado (100 mM, pH 7,4), de forma que, ao final da reação, o substrato se encontre tamponado no pH desejado, na concentração ideal (1%), para ensaio de atividade.

5.10.2 Efeito da temperatura

Para avaliação do efeito da temperatura na atividade pectinolítica, foram realizados ensaios enzimáticos com as amostras do extrato bruto e a fração concentrada, alterando-se a temperatura de incubação de 30°C a 80°C a cada 10°C. O efeito da temperatura foi determinado pela atividade enzimática da mesma forma descrita pelo protocolo 5.4.

5.10.3 Termoestabilidade

A avaliação da termoestabilidade da enzima foi realizada através da pré-incubação das amostras de extrato bruto nas temperaturas de 30,60 e 80°C, sendo retiradas alíquotas em tempos diferentes. A atividade enzimática foi determinada da mesma forma descrita no item 5.4.

5.10.4 Efeito dos íons metálicos e reagentes ativadores/inibidores

Para determinação dos efeitos de íons metálicos e modificadores de aminoácidos sobre a atividade pectinolítica, as amostras do extrato bruto e da fração concentrada foram pré-incubadas durante 20 minutos, a 28 °C, na presença dos íons Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} nas concentrações finais de 1 e 10 mmol.L⁻¹. A influência dos reagentes DTT (ditiotreitól), SDS (dodecil sulfato de sódio), β -mercaptoetanol e EDTA foram testadas sobre a atividade enzimática como descrito no do item 5.4, nas mesmas concentrações finais e condições.

5.10.5 Compostos fenólicos

O efeito de ativação/inibição da pectinase pelos compostos fenólicos (ácido transferúlico, ácido4-hidroxibenzóico, ácido p-cumárico, siringaldeído, ácido transcinâmico, ácido tânico, ácido gálico e vanilina), assim como pelo etanol foram adaptados do item 5.10.4: as amostras do extrato bruto e da fração concentrada foram incubadas previamente durante 20 minutos a 28 °C com 2 mg/mL dos reagentes ou 20% (v/v) de etanol e foram testadas sobre a atividade enzimática como descrita no item 5.4.

5.11 Hidrólise do substrato lignocelulósico

A capacidade de hidrólise do extrato bruto e da fração concentrada sobre a biomassa lignocelulolítica (casca de café robusta) pré-tratada e não pré-tratada foram realizadas utilizando amostras obtidas em cultivos otimizados para produção de pectinases. Os ensaios foram realizados em microescala, em tubos de 1,5 mL. Foram adicionados aos tubos 0,01g de casca de café robusta (1%*m/v*) pré-tratada e não pré-tratada e 50 μg de proteína do extrato bruto e da fração concentrada. O volume foi completado para 1 mL com tampão fosfato de sódio pH 6.0 100 mM. As amostras foram incubadas a 60°C, em agitação de 720 RPM em agitador de microtúbulos *vortemp* (Labnet). Foram realizados testes nos períodos de 0, 4, 12 e 24 horas de incubação. A atividade enzimática foi testada como descrito no item 5.4.

5.12 Design Experimental, Análise Estatística e Programas Utilizados

Todos os cultivos realizados neste trabalho foram realizados em triplicatas biológicas, todos os ensaios descritos foram realizados em quintuplicatas para cada replicata, visando minimizar os erros de pipetagem. Os gráficos representam o valor médio entre as triplicatas biológicas e as barras de erros estão representando o desvio padrão entre as mesmas. Todos os dados deste trabalho foram produzidos e editados no *software* Microsoft Excel 2021.

6. Resultados e Discussão

6.1 Screening enzimático da cepa 3RE22

A quantificação da atividade enzimática de pectinase, mananase, xilanase e CMCase do cultivo de *P. formosus* em licor de casca de café pré-tratada foi observado durante 10 dias, com a finalidade de se determinar os maiores valores de atividade de acordo com o tempo. Observa-se através da figura 9 que a pectinase teve seus picos de atividade no sexto e no oitavo dia, com 0,46 e 0,47 UI/mL respectivamente, com um decréscimo ao nono dia. A atividade de xilanase foi maior quando comparada com as outras, obtendo o pico de atividade ao sexto dia e se equiparando a pectinase no quinto dia. Não foram detectadas, em nenhum dos dias avaliados, atividade de CMCase nestas condições de cultivo, porém para mananase foi observado atividade a partir do sétimo dia.

Os resultados obtidos demonstraram o potencial de secreção de hemicelulases e pectinases pelo fungo *P. formosus* quando cultivado na casca de café robusta, demonstrando o poder de produção de diversas enzimas desse isolado. Peláez et al. (2022) avaliaram a capacidade de produção de diversas enzimas (Fpase, lacase, xilanase, peroxidase e celulase) do co-cultivo de vários isolados fúngicos (*Panus lecomtei*, *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune*, *Coprinus* sp., *Chrysosporium lucknowense* e *Laetisaria arvalis*) em conjunto com *Trichoderma reesei* utilizando resíduos de óleo de palma e bagaço de cana como substrato, demonstrando a pluralidade de enzimas produzidas, sendo as mais relevantes lacase e xilanase. O trabalho de MARđETKO e colaboradores (2021) verificou a atividade lignocelulolítica de sete isolados fúngicos em fermentação submersa, dentre eles utilizaram o fungo *Paecilomyces variotii*. A partir dos resultados pode ser observado que houve produção de diversas enzimas (arabinase, mananase, xilanase, endoglucanase, exoglucanase e pectinase) pelos isolados em concentrações diferentes.

O café robusta não possui muitos trabalhos recentes relacionados a produção enzimática. Phuong et al. (2019) em sua pesquisa utilizou a polpa do café para descobrir

sua capacidade de fermentação para produção de etanol. Em outro trabalho realizado por Putri *et al.* (2019) foram utilizados actinomicetos para avaliar a produção de enzimas (celulase e xilanase) na polpa de café, evidenciando que há potenciais estudos que podem ser desenvolvidos sobre os resíduos de café robusta.

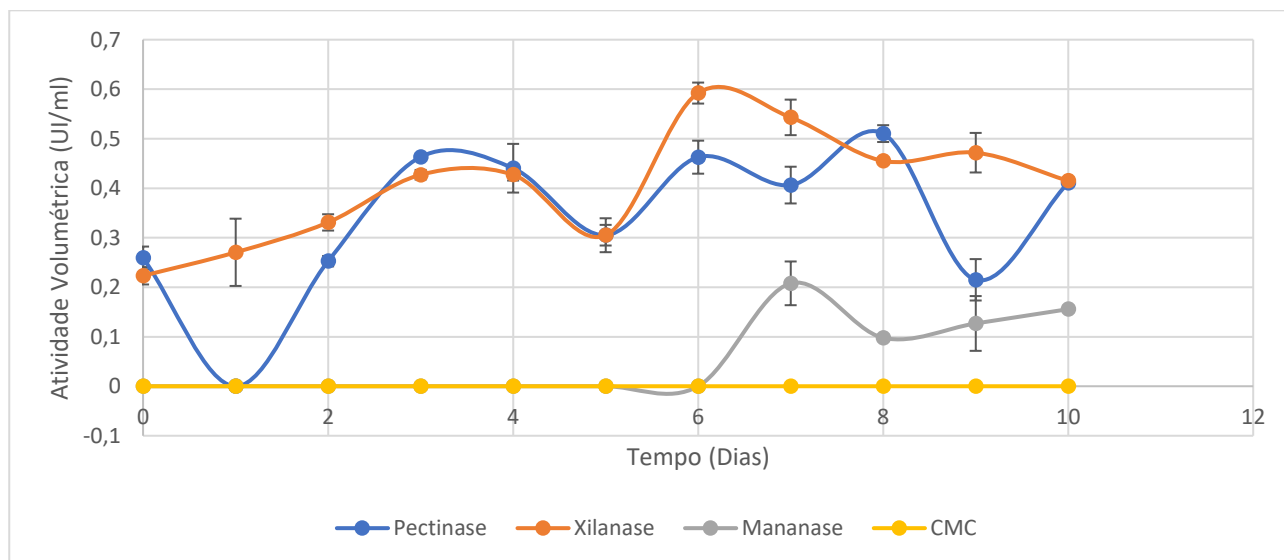


Figura 9: Perfil de indução enzimática de *P. formosus* 3RE22 em meio de cultura líquido acrescido de resíduos de café robusta 1% (m/v) durante 10 dias em meio líquido. As barras de erro representam o desvio padrão entre as três replicatas biológicas.

6.2 Concentração do extrato bruto

De acordo com os resultados da figura 9 o sétimo dia foi definido para a extração do extrato bruto de *P. formosus* em licor de casca de café robusta, em função de sua alta produção de pectinase. O extrato bruto foi concentrado dez vezes pela ultrafiltração com uma membrana de corte de 30kDa, sendo separados como extrato bruto, concentrado e filtrado.

Tabela 1: Perfil pectinolítico de *P. formosus* no extrato bruto, concentrado e ultrafiltrado.

Fração	Volume (mL)	Atividade enzimática (UI/mL)	Atividade enzimática total (U.I.)
Extrato Bruto	400	0,43 ± 0,01	172
Concentrado	40	1,54 ± 0,06	61,6
Ultrafiltrado	360	0,21 ± 0,07	75,6

Os resultados da atividade pectinolítica estão apresentados na tabela 1, a maior parte da atividade de pectinase ficou contida na fração concentrada, cerca de 36%, sendo que na parte ultrafiltrada há aproximadamente 44% da atividade total por ter um volume maior, sendo a atividade enzimática total a quantificação de pectinase no volume total de cada amostra. A soma destas duas frações não representa o valor final das atividades obtidas se deve ao fato de algumas enzimas possuírem sinergismo de modo que podem ter sido separadas durante a concentração.

6.3 Caracterização bioquímica da pectinase

6.3.1 Efeito do pH

O efeito do pH sobre a atividade pectinolíticas do extrato bruto está demonstrada na figura 10, pode ser visto que nos pH 4 e 9 houve picos de atividade de pectinase.

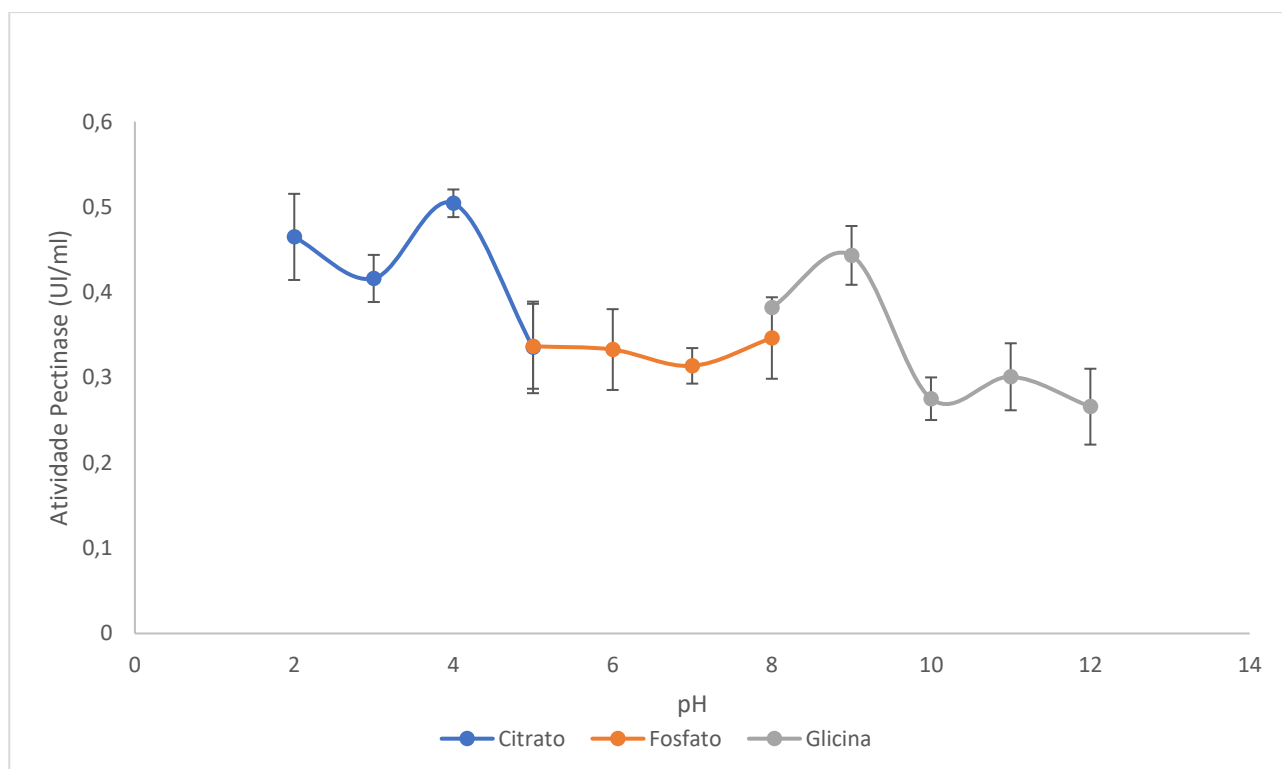


Figura 10: Caracterização do efeito do pH sobre as atividades enzimática da pectinase do extrato bruto de *P. formosus* crescido em casca de café robusta. Citrato de sódio foi utilizado pH 2 até 5; pH 5 até 8 foi utilizado fosfato de sódio; pH 8 até 12 foi utilizado glicina. As barras de erro representam o desvio padrão entre as três replicatas biológicas.

Observando a figura 11, efeito do pH sobre a fração concentrada, houve picos de atividade nos pH 4, 6 e 10. Há uma diferença notável na atividade quando se faz a troca do tampão fosfato de sódio para glicina, sendo mais evidenciado na porção concentrada, este efeito pode ser causado pelos componentes diferentes dos tampões pela interação das

diferentes pectinases existentes na porção concentrada, já que não está purificada. As diferentes condições de pH alteraram a atividade da pectinase sobre o substrato, podendo desestabilizar a estrutura da enzima, afetando sua atividade, tal situação pode se dar pelo conglomerado de enzimas que estão em conjunto com a pectinase, podendo haver uma sinergia, visto que a enzima não está isolada.

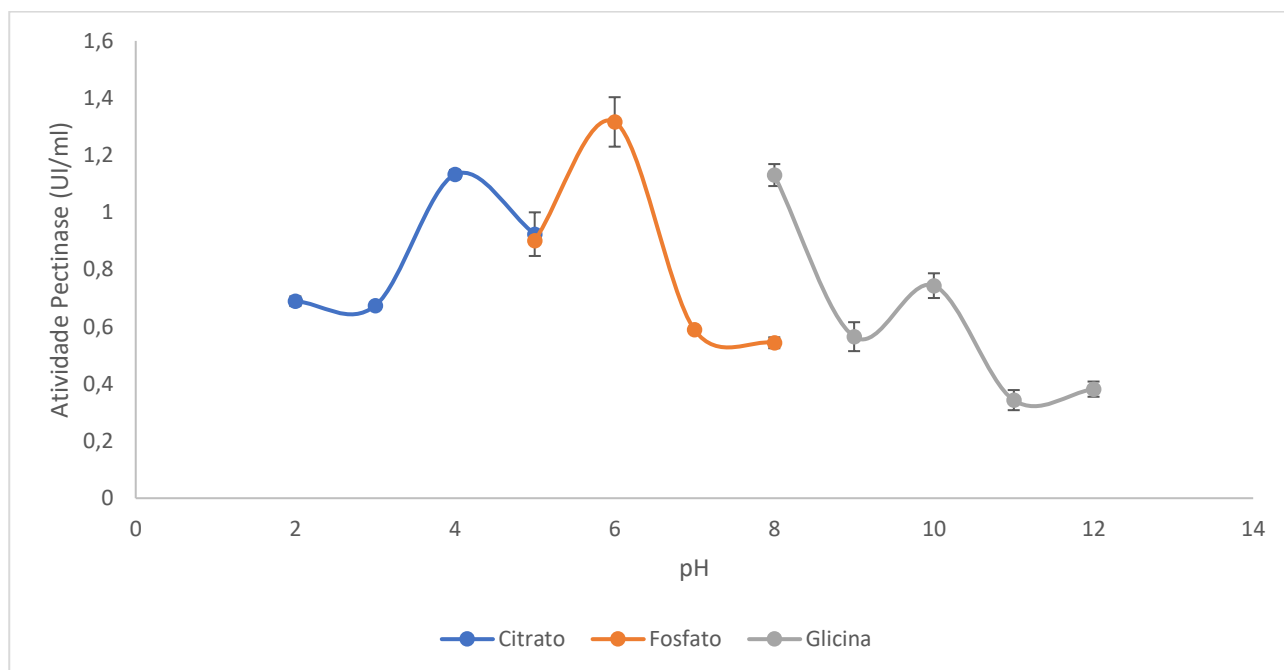


Figura 11: Caracterização do efeito do pH sobre as atividades enzimática da pectinase da fração concentrada de *P. formosus* crescido em casca de café robusta. Citrato de sódio foi utilizado pH 2 até 5; pH 5 até 8 foi utilizado fosfato de sódio; ph 8 até 12 foi utilizado glicina. As barras de erro representam o desvio padrão entre as três replicatas biológicas.

No trabalho de Esawy *et al.* (2022) foi isolado uma cepa de *Aspergillus niger* de laranjas em decomposição, cuja atividade pectinolítica foi de 13,8U/ml, os autores testaram o pH e temperatura que demonstrassem maior atividade de pectinase. De acordo com os resultados no pH 4 foi observada uma das maiores atividades de pectinase nas condições testadas, atingindo o pico no pH 5 com constante declínio, demonstrando que diferentes pHs influenciam a capacidade da enzima em exercer sua função.

No trabalho de Jallil *et al.* (2023) utilizando também *Aspergillus niger* de laranjas em decomposição, foi observado o efeito do pH sobre a atividade de pectinase, sendo que no pH 4,5 se obteve maior atividade pectinolítica, indicando que este isolado fúngico se favorece em ambiente ácido. A estabilidade de pectinases fúngicas pode acontecer em meio ácido e alcalino, porém sua estabilidade e sua atividade máxima podem aparecer em diferentes faixas de pH. No trabalho de Ferreira *et.al.* (2010) utilizando uma mistura de farelo de trigo, bagaço de laranja e bagaço de cana como substrato para o isolado

Penicillium viridicatum, houve grande estabilidade da pectinase nas faixas de pH 7,5 até 9,5.

6.3.2 Efeito da temperatura

A figura 12 representa o efeito da temperatura sobre a atividade enzimática de pectinase no extrato bruto e na fração concentrada. De acordo com a figura 12, a maior atividade ocorreu na faixa de 50-60°C, diminuindo aos 70°C para as duas amostras.

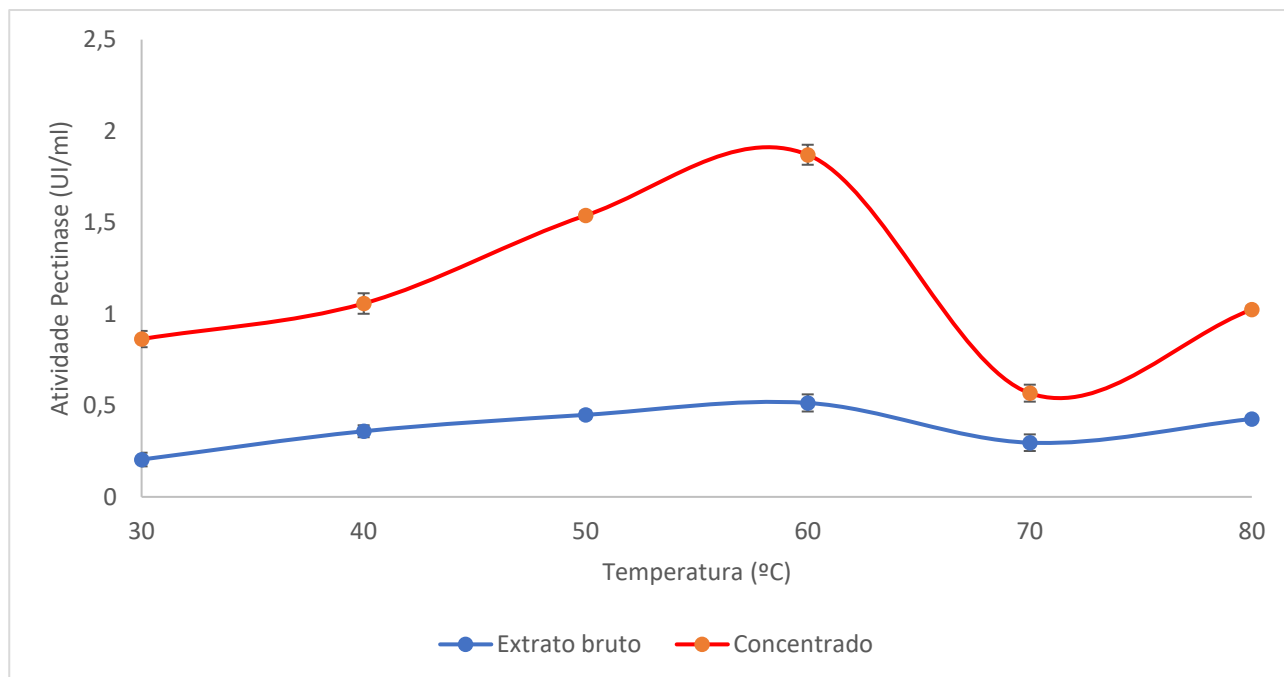


Figura 12: Influência da temperatura sobre as atividades enzimáticas da pectinase do extrato bruto e concentrado de *P. formosus* em casca de café robusta com tempo de incubação de 10 minutos. As barras de erro representam o desvio padrão entre as três replicatas biológicas.

As pectinases são estáveis e ativas em uma grande faixa de temperatura (30-80°C), impulsionando grande valor industrial por ser menos susceptível a inativação térmica (SUDEEP KC *et al.*, 2020). Na pesquisa de Guimarães *et al.* (2023) utilizando a casca de maracujá como substrato para o fungo *Aspergillus japonicus* para produção de pectinase, realizaram o teste do efeito da temperatura sobre a atividade pectinolítica e a melhor temperatura foi de 60°C corroborando com os resultados apresentados neste trabalho. Gu *et al.* (2023) testou a produção de diversas enzimas do fungo *Lentinus edodes* enriquecido com selênio, a caracterização das enzimas, quanto ao efeito da temperatura, foi constatada que houve aumento da atividade até os 50°C, diminuindo conforme o aumento da temperatura.

6.3.3 Efeito de compostos fenólicos

Sobre a avaliação da inibição ou ativação da pectinase quanto aos compostos fenólicos no extrato bruto (figura 13) e na fração concentrada (figura 14), houve inativação completa da enzima quando adicionados o ácido tânico e o ácido gálico no extrato bruto, já os outros compostos tiveram o efeito contrário, aumentando significativamente a atividade pectinolítica. Uma provável explicação pode se dar pelo fato de o extrato bruto ter uma gama de enzimas atuando em sinergia ou em antagonismo, alterando a atuação da pectinase, outro fator é a baixa atividade pectinolítica encontrada no extrato bruto, podendo estar superestimando os resultados encontrados no mesmo.

Taninos são compostos fenólicos capazes de precipitar proteínas, formando complexos com proteínas. Primeiro ocorre a ligação com a proteína e depois agregação, resultando na formação do precipitado. Sendo que para isto acontecer são necessários vários fatores como concentração, ponto isoelétrico da proteína, pH, força iônica da solução e também presença de outros compostos na solução (ADAMCZYK *et al.*, 2017).

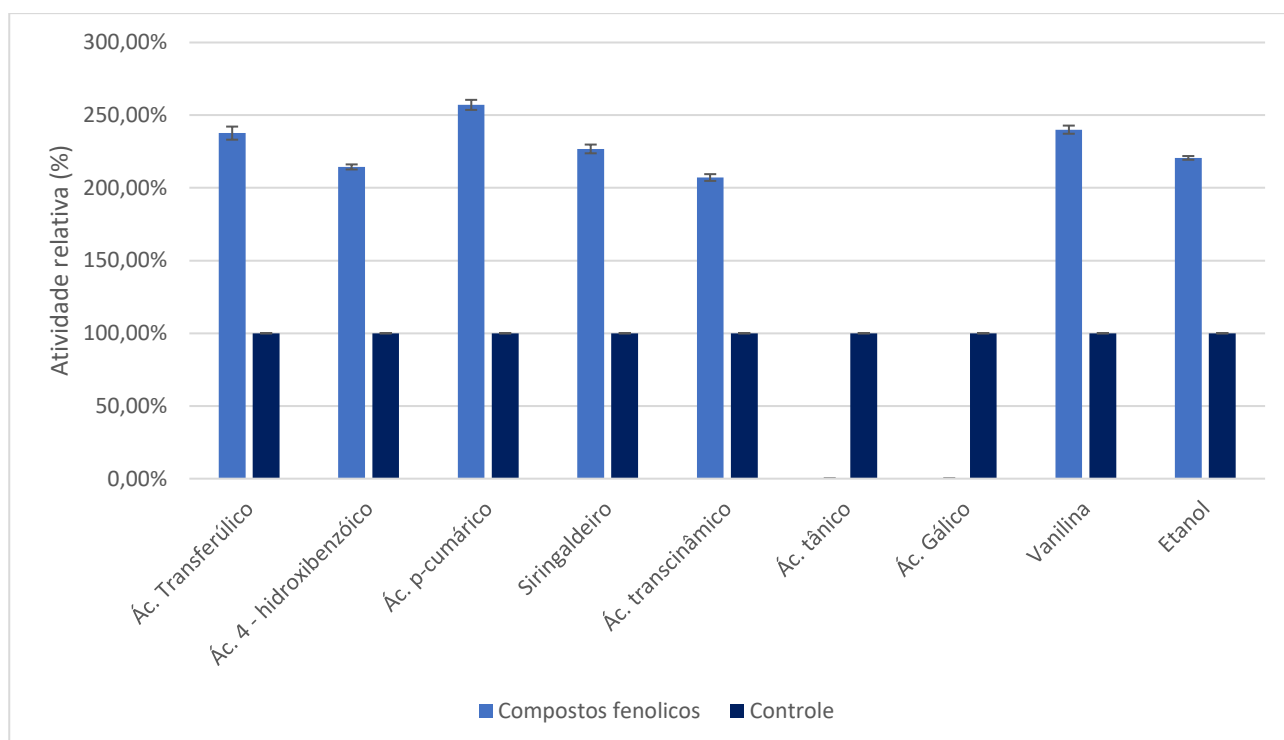


Figura 13: Efeito de compostos fenólicos sobre a atividade da pectinase no extrato bruto. Controle: 2mg/ml. As barras de erro representam o desvio padrão entre as três replicatas biológicas.

A fração concentrada apresenta aumento da atividade quando adicionados o ácido transferúlico, ácido p-cumárico e ácido tânico em 41,02%, 6,27% e 18,85%

respectivamente. Siringaldeído, ácido transcinâmico e vanilina inibiram a atividade da pectinase em 25,80%, 29,12% e 28,24% respectivamente. As plantas em resposta a infecções acumulam composto fenólicos na área infectada, obtendo uma ação antioxidante por exemplo, inibindo proteínas específicas, bloqueando a função de diversas enzimas, resultando no controle da doença (SRIVASTAVA et al. 2013). Compostos fenólicos derivados da lignina, através de pré-tratamentos na biomassa lignocelulósica podem induzir mudanças na composição química da pectina através da formação de ligações covalentes e não covalentes inibindo a hidrólise enzimática (YANG *et al.*, 2019; ANDRADE, 2020; MORO, 2015). Tal fato pode ser observado no trabalho de Zhuang *et al.* (2016) em que utilizaram o pré-tratamento *Liquid hot water* em lascas de madeira de álamo tremedor para caracterizar as chamadas pseudo-ligninas (produtos de degradação de açúcares condensados com os da lignina, formando um precipitado sobre a celulose). Neste trabalho, os autores mediram a quantidade de vários monômeros liberados após a despolimerização da lignina, como o ácido 4-hidroxibenzoico, siringaldeído, vanilina e guaiacol.

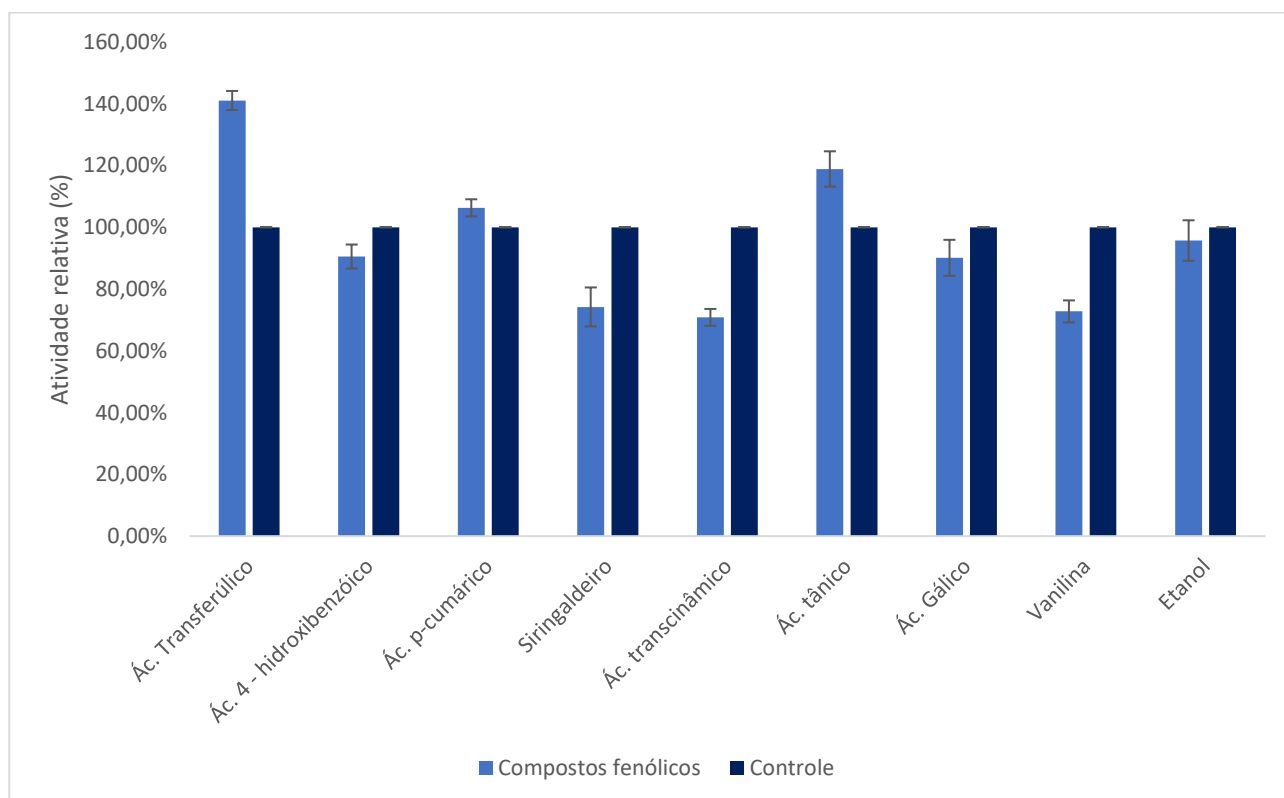


Figura 14: Efeito de compostos fenólicos sobre a atividade de pectinase no extrato bruto concentrado. Controle: 2mg/ml. As barras de erro representam o desvio padrão entre as três replicatas biológicas.

6.3.4 Efeito dos íons metálicos e reagentes ativadores/inibidores

A avaliação do efeito dos íons sobre a atividade pectinolítica no extrato bruto é demonstrado na figura 15. Na concentração de 10mM os íons Ca^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ e

o β -mercaptoetanol manifestaram efeitos estimulantes na atividade. Os íons Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , além do DTT e SDS inibiram completamente a atividade da pectinase na concentração de 10mM. Em 1mM o EDTA inibiu grande parte da atividade, β -mercaptoetanol não apresentou grande diferença, enquanto SDS, Mg^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} influenciaram positivamente para a ação da atividade da enzima.

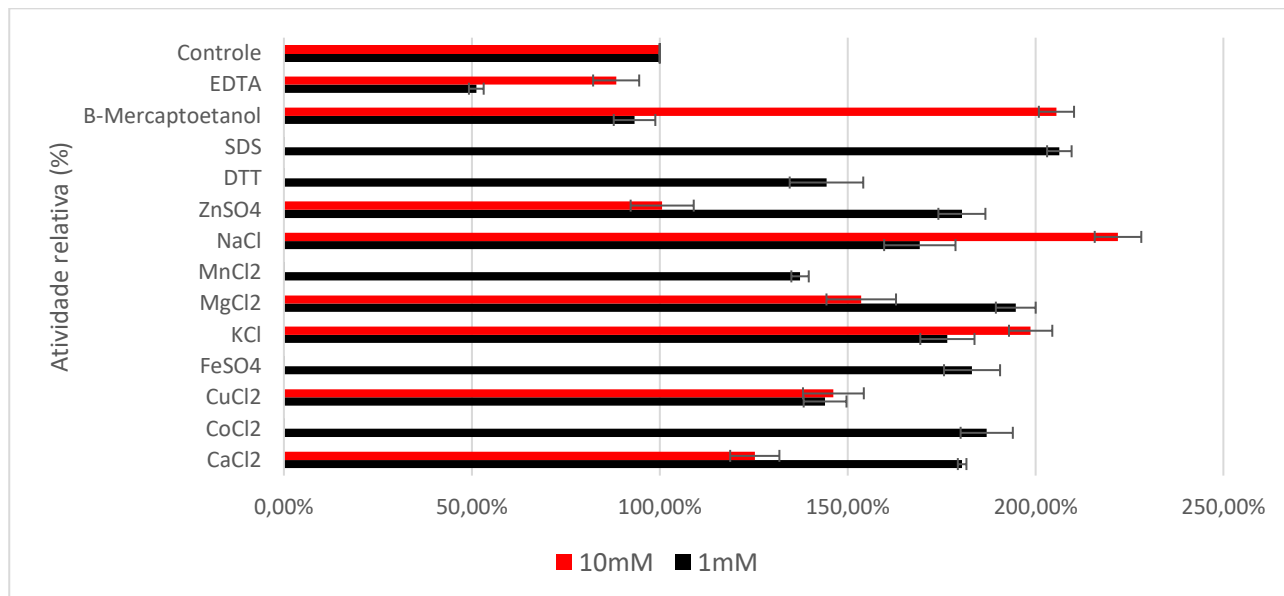


Figura 15: Efeito de íons metálicos e reagentes ativadores/inibidores sobre a atividade de pectinase no extrato bruto nas concentrações de 1mM e 10mM. As barras de erro representam o desvio padrão entre as três replicatas biológicas.

O efeito de vários íons metálicos foi avaliado por Ferreira *et al.* (2010) com o fungo *Penicillium viridicatum* utilizando uma mistura de farelo de trigo, bagaço de laranja e bagaço de cana como substrato para produção de pectina liase. Dentre os resultados houve aqueles que inibiram quase 100% da atividade (Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+ e Fe^{3+}) na concentração de 2mM, já na presença dos íons Ca^{2+} e K^+ houve aumento de 17% e 84% respectivamente. O trabalho de Yadav *et al.* (2017) é sobre a caracterização e purificação de uma pectina liase alcalina produzida pelo isolado *Fusarium lateritum* com pectina cítrica como substrato demonstrou a atuação dos íons na concentração de 1mM sobre a atividade enzimática. A maioria dos íons testados manifestou ações inibitórias, assim como KMnO_4 e $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$ que inibiram completamente a atividade, exceto Hg^{2+} e Mn^{2+} .

Na fração concentrada tanto nas concentrações de 1mM quanto de 10mM o EDTA favoreceu a atividade da pectinase em 24,72% e 33,02% respectivamente. Para 1mM os íons Fe^{2+} , K^+ , Cu^{2+} inibiram de maneira significativa, enquanto as outras variáveis testadas não apresentaram grande efeito. Os resultados de SDS, Zn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} e Fe^{2+} na concentração de 10mM causaram grande inibição, enquanto K^+ , Mn^{2+} e DTT exibiram até 20% de influência sobre a enzima.

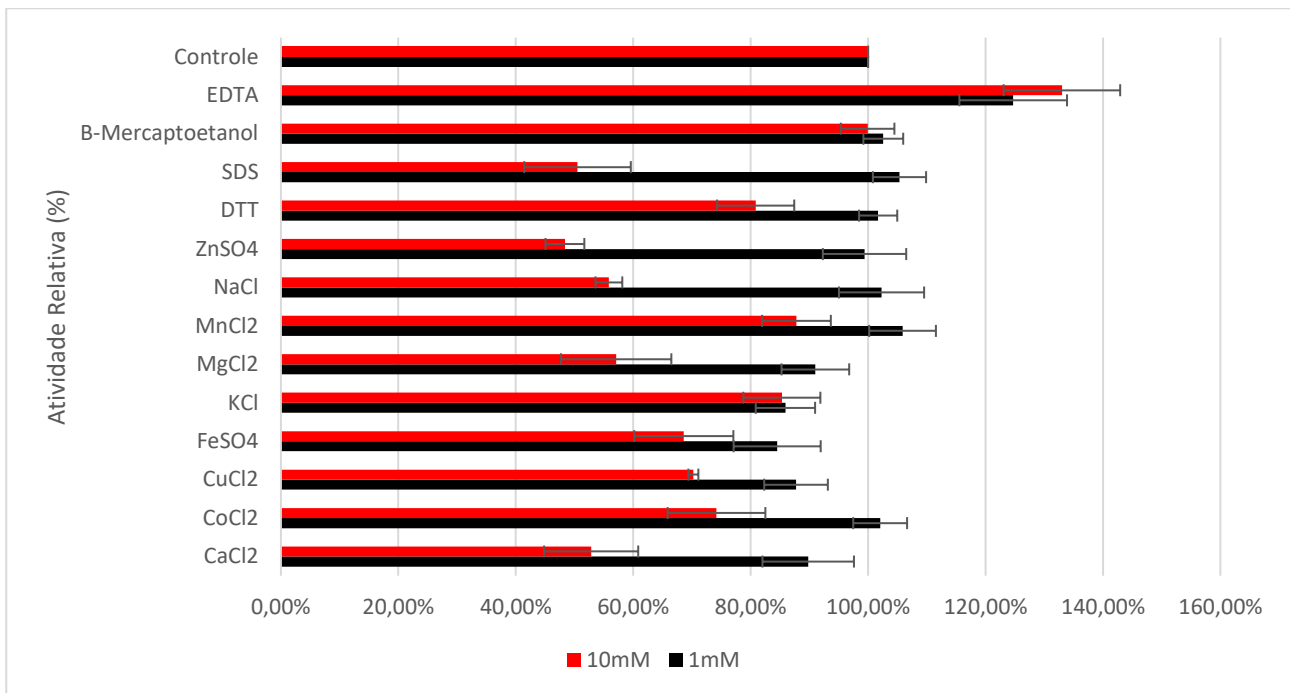


Figura 16: Efeito de íons metálicos e reagentes ativadores/inibidores sobre a atividade de pectinase no extrato bruto concentrado nas concentrações de 1mM e 10 mM. As barras de erro representam o desvio padrão entre as três replicatas biológicas.

Na pesquisa de Esawy *et al.* (2022) foi utilizado pectina cítrica para otimização e caracterização de pectinase por *Aspergillus niger*. Os resultados indicaram efeitos inibitórios quando colocando em conjunto com Hg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} e I^{3+} , enquanto NH_4^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Mn^{2+} e ácido ascórbico ativaram a enzima, enquanto EDTA e Ca^{2+} não impulsionou efeitos notáveis.

6.3.5 Termoestabilidade

Os resultados de termoestabilidade a 30°C da pectinase no extrato bruto e extrato bruto concentrado são representados na figura 17. Observa-se um aumento de atividade nas primeiras 12 horas de incubação, tanto no extrato bruto quanto no concentrado, com um declínio as 36 horas, aumentando novamente sua atividade em 72 horas. As duas frações suportaram 72 horas sem atingir sua meia-vida, acontecendo ainda aumento na atividade nas últimas horas testadas.

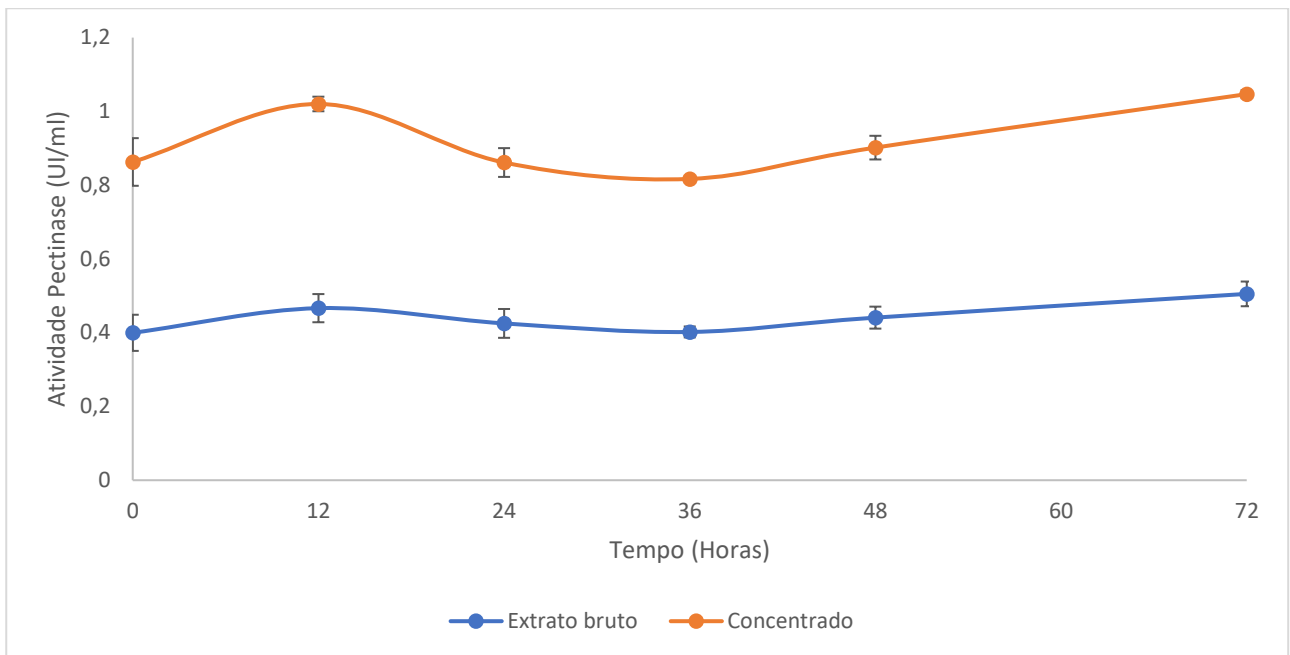


Figura 17: Termoestabilidade da atividade de pectinase no extrato bruto e extrato bruto concentrado com 30°C, realizada no período de 72 horas. As barras de erro representam o desvio padrão entre as três replicatas biológicas.

A figura 18 demonstra os resultados da termoestabilidade à 60°C, em que a enzima se mostrou estável no extrato bruto com pequena variação da atividade enzimática. Na fração concentrada houve declínio da atividade nas primeiras 24 horas, com um aumento na atividade, permanecendo estável até às 72 horas.

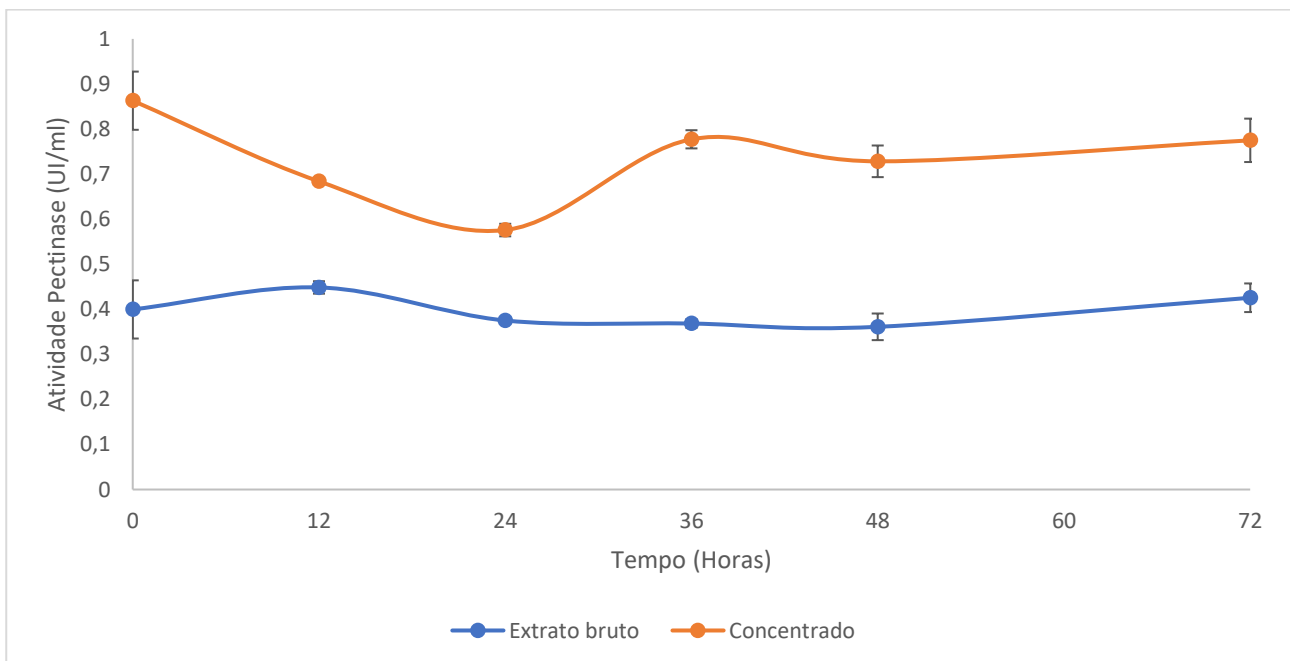


Figura 18: Termoestabilidade da atividade de pectinase no extrato bruto e extrato bruto concentrado com 60°C, realizada no período de 72 horas. As barras de erro representam o desvio padrão entre as três replicatas biológicas.

Os resultados da termoestabilidade em 80°C estão demonstrados na figura 19. A fração concentrada apresentou declínio na atividade no período de 12 até 24 horas, com um aumento da atividade as 36 horas, diminuindo sua atividade as 72 horas. O extrato bruto se apresentou estável durante toda a exposição a esta temperatura, podendo acontecer por ser uma amostra heterogênea, podendo apresentar sinergia ou antagonismo com outras enzimas presentes, modificando reações e comportamentos da pectinase. No presente trabalho a enzima se mostrou mais termoestável nas temperaturas de 30°C e 60°C, mantendo a atividade enzimática em níveis ótimos por todo o período testado, sendo que não foi atingido a meia-vida, podendo acontecer por não ser uma amostra purificada

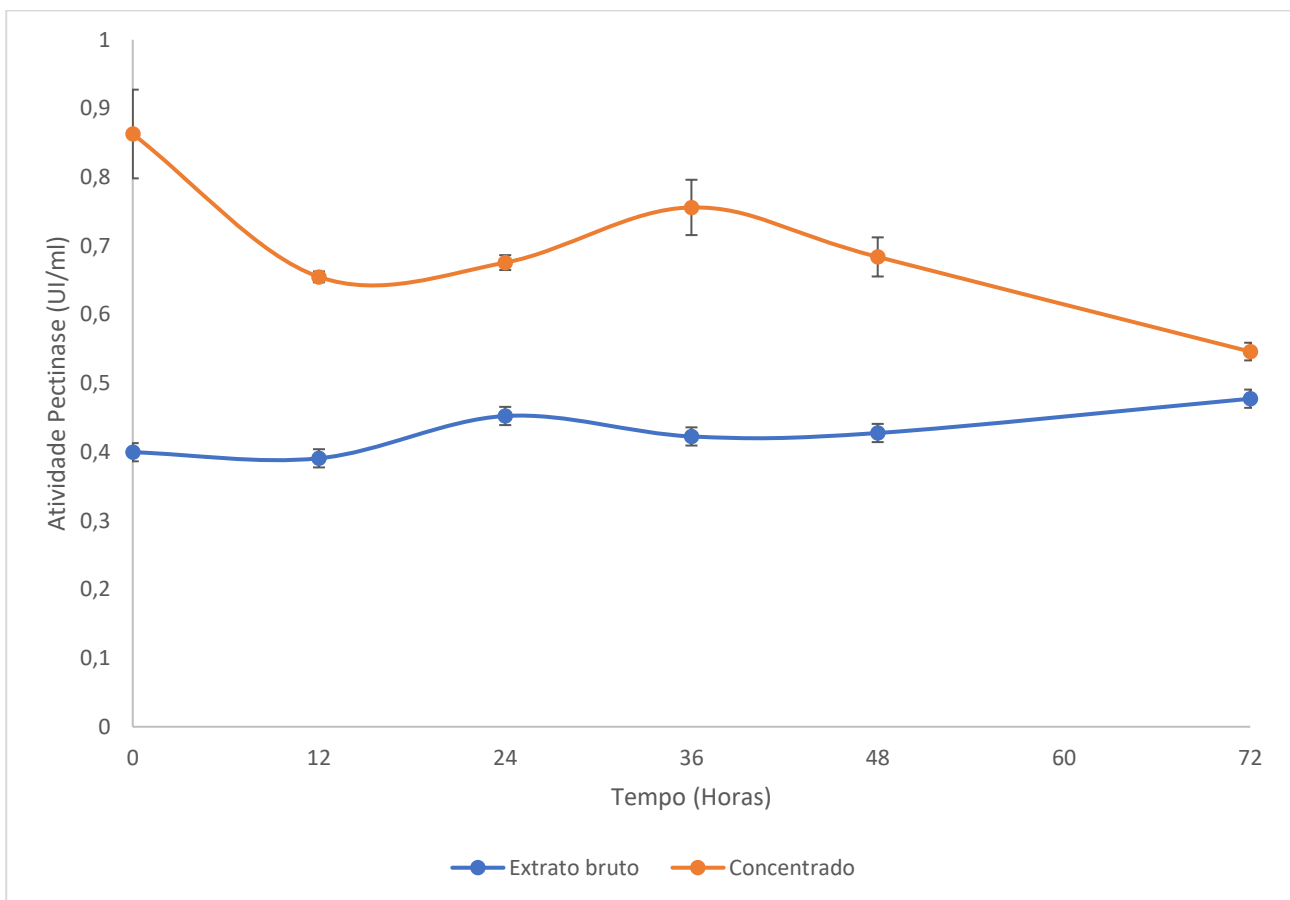


Figura 19: Termoestabilidade da atividade de pectinase no extrato bruto e extrato bruto concentrado com 80°C, realizada no período de 72 horas. As barras de erro representam o desvio padrão entre as três replicatas biológicas.

Nsude e colaboradores (2022) realizaram um estudo sobre as propriedades cinéticas e termodinâmicas de uma pectinase de *Trichoderma longibrachiatum*, avaliando a termoestabilidade da enzima frente a diferentes temperaturas, 30-80°C durante 120 minutos. Os autores observaram decréscimo da atividade pectinolítica conforme a temperatura aumentava, aos 70°C houve perda de aproximadamente 65% da atividade,

houve estabilidade da atividade com de 30-50°C com perda de 30% da atividade quando submetida ao tratamento com 60°C.

Para bioprocessos é interessante que as enzimas tenham resistência e fiquem estáveis a variadas temperaturas, pois assim a atividade se mantém utilizando menos recursos, como resfriadores ou aquecedores, diminuindo os custos com a produção da enzima de interesse.

Guan *et al.*, (2020) verificou em seu trabalho o pH e temperatura ótimos para produção de pectinases de um isolado de *Bacillus* sp., assim como a termoestabilidade entre 40-60°C durante 1 hora. A pectinase desse estudo se manteve bem estável em todas as temperaturas testadas perdendo de 45-50% da sua atividade.

O trabalho de Amadi e colaboradores (2022) avaliaram a purificação das enzimas celulase, xilanase e pectinase separadas e em conjunto para determinar como seria sua atividade catalítica estando nessas condições. As três enzimas apresentaram certa estabilidade até 50°C, porém foi demonstrado que quanto mais purificada menor a sua estabilidade. Segundo os autores, quando o coquetel chamado “trienzimático” é avaliado há maior estabilidade, sugerindo uma proteção maior a desnaturação térmica.

6.4 Hidrólise do substrato lignocelulósico

A figura 20 representa a capacidade do extrato bruto e a fração concentrada de hidrolisar a parede celular da casca de café robusta com e sem pré-tratamento, no intervalo de 4, 12 e 24 horas.

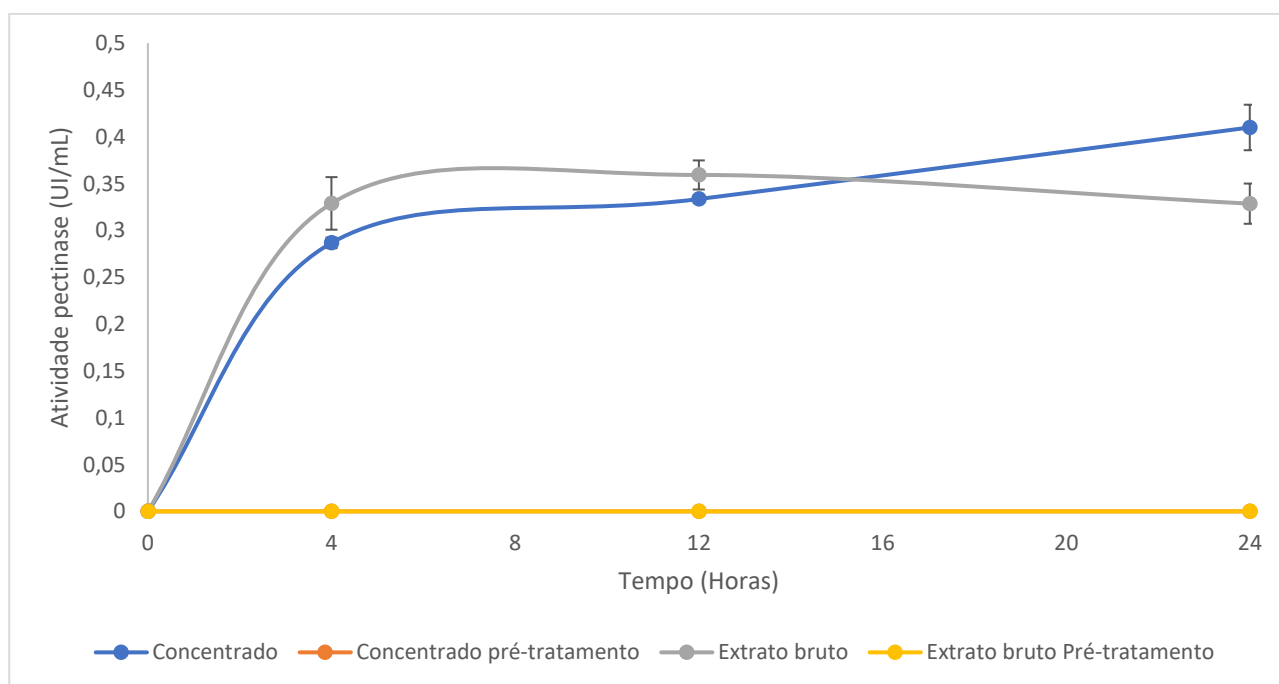


Figura 20: Hidrólise enzimática da casca de café robusta 1% não pré-tratada e pré-tratada, utilizando 50 µg de proteína do extrato bruto e da fração concentrada (60°C, 720 RMP) no período de 0, 4, 12 e 24 horas. As barras de erro representam o desvio padrão entre as três replicatas biológicas.

Nas primeiras 4 horas foi apresentada capacidade hidrolítica tanto pelo extrato bruto como a fração concentrada, aumentando um pouco mais quando observadas após 12 horas de teste. No período de 24 horas houve aumento na atividade pectinolítica pela fração concentrada, evidenciando aumento da degradação dos compostos da parede celular. Nos testes utilizando a casca de café robusta pré-tratada não houve atividade pectinolítica, uma possível explicação é o próprio pré-tratamento *Liquid hot water*, que solubiliza a pectina presente na parede celular vegetal para o meio líquido. Outro fator importante seria os compostos fenólicos que podem ser liberados durante o pré-tratamento inativando a pectinase presente no extrato bruto e concentrado.

Nadhifah e seus colaboradores (2023) pesquisando sobre enzimas xilanase e pectinase de ascomicetos marinhos realizaram o teste de hidrólise sobre diversos substratos diversos (pectina e xilana) e cascas de maçã, laranja e cacau. Os ensaios foram realizados a 40°C observando os resultados as 0, 4, 24, 48 e 72 horas. Neste ensaio, foi constatado que a partir da primeira hora já havia produção de monossacarídeos como ácido galacturônico pela pectinase e oligossacarídeos como xilopentose, xilotetraose pela xilanase.

O trabalho de Li *et al.*, (2023) utilizando *Bacillus subtilis* para a hidrólise de okara (resíduo de extrato de soja e outros vegetais), utilizando a hidrólise ácida conseguiram medir a quantidade dos componentes da parede celular e utilizar diversas enzimas (pectinase, xilanase, β -glicosidase) para a degradação dos compostos lignocelulósico do okara.

Semenova e colaboradores (2023) fizeram uma pesquisa sobre a interação de diversas arabinases sobre a polpa de beterraba e bagaço da maçã. Das diversas proporções de enzimas a que se destacou foi a adição de endoarabinase com arabinofuranosidase ou arabinoxilana-arabinofuranidrolase com endoarabinase em 20 e 40%, sendo demonstrado a conversão de grande parte do bagaço da maçã em monossacarídeos.

6.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

Na figura 21 pode ser observado as bandas proteicas do extrato bruto e da fração concentrada. Após a etapa de concentração ainda pode se ver que as múltiplas bandas

continuam mostrando que nas duas amostras existem as mesmas proteínas, porém em concentrações diferentes, evidenciando também a diversidade de proteínas presentes. Por se tratar de uma amostra muito escura e difícil de se separar a pigmentação da enzima, não se obtiveram mais resultados relevantes.

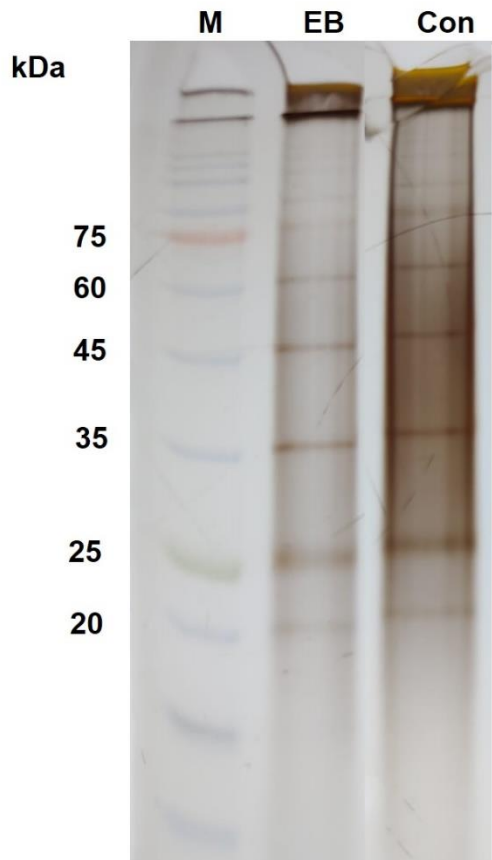


Figura 21: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% do extrato bruto e fração concentrada
M: Marcador; EB: Extrato bruto; Con.: Concentrado

7. Conclusões

- O *Paecilomyces variottii* foi capaz de produzir várias enzimas utilizando a casca de café robusta pré-tratado como substrato, com uma produção considerável de pectinase.
- A maior atividade pectinolítica foi observada no período do sexto ao oitavo dia.
- O extrato bruto concentrado teve atividade máxima a 60°C, nas faixas de pH 4 e 6, se mantendo estável a 30 e 60°C por 72h, já o extrato bruto se manteve termoestável na temperatura de 80°C.
- O extrato bruto se mostrou estimulado pelos íons Ca^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ e o B-mercaptoetanol, enquanto Co^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , além do DTT e SDS inibiram integralmente a atividade da pectinase.
- O extrato bruto concentrado foi inibido pela maioria dos íons a 10mM e pelos compostos fenólicos, enquanto o extrato bruto foi estimulado pelos compostos fenólicos, com exceção do ácido tânico e gálico.

8. Perspectivas futuras

- Realizar purificação por cromatografia de troca iônica,
- Identificar as pectinases purificadas.
- Realizar zimograma da pectinase purificada.
- Realizar testes de viscosidade e clarificação de sucos e frutas.

9.Referências bibliográficas

ABUAJAH, Christian Izuchukwu; OGBONNA, Augustine Chima; CHUKEZE, Ezenwa James; IKPEME, Christine Amaka; ASOGWA, Kingsley Kelechi. A glucose oxidase peroxidase-coupled continuous assay protocol for the determination of cellulase activity in the laboratory: the abujah method. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 647, jun. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2022.114649>.

ADAMCZYK, Bartosz; SIMON, Judy; KITUNEN, Veikko; ADAMCZYK, Sylwia; SMOLANDER, Aino. Tannins and Their Complex Interaction with Different Organic Nitrogen Compounds and Enzymes: old paradigms versus recent advances. **Chemistryopen**, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 610-614, 16 ago. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/open.201700113>.

AGUIAR, I. R.; FERREIRA-NOZAWA, M. S. Screening de fungos filamentosos voltado para a produção de enzimas. **Micologia: Fungos e/ou seus Metabólitos como Objeto de Estudo**, p. 149-156, 2 jul. 2020.

ALBERSHEIM, P.. Pectin lyase from fungi. **Methods In Enzymology**, p. 628-631, 1966.

AMADI, O.C.; AWODIRAN, I.P.; MONEKE, A.N.; NWAGU, T.N.; EGONG, J.e.; CHUKWU, G.C.. Concurrent production of cellulase, xylanase, pectinase and immobilization by combined Cross-linked enzyme aggregate strategy- advancing tri-enzyme biocatalysis. **Bioresource Technology Reports**, [S.L.], v. 18, jun. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101019>.

ANDRADE, Maria Carolina. **Produção e otimização de enzimas holocelulolíticas por Paecilomyces formosus em diferentes resíduos de café**. 2020. 245 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

BAAZEEM, Alaa; ALORABI, Mohammed; MANIKANDAN, Palanisamy; ALOTAIBI, Saqer S.; ALMANEA, Abdulaziz; ABDEL-HADI, Ahmed; VIJAYARAGHAVAN, Ponnuswamy; RAJ, Subhanandharaj Russalamma Flanet; KIM, Young Ock; KIM, Hak-Jae. Paecilomyces formosus MD12, a Biocontrol Agent to Treat Meloidogyne incognita on Brinjal in Green House. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 7, n. 8, 3 ago. 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/jof7080632>.

BARROS, Jaime; SERRANI-YARCE, Juan C.; CHEN, Fang; BAXTER, David; VENABLES, Barney J.; DIXON, Richard A.. Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis. **Nature Plants**, [S.L.], v. 2, n. 6, p. 1-9, 9 maio 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nplants.2016.50>.

BANERJEE, Srijoni; PANDIT, Chetan; GUNDUPALLI, Marttin Paulraj; PANDIT, Soumya; RAI, Nishant; LAHIRI, Dibyajit; CHAUBEY, Kundan Kumar; JOSHI, Sanket J.. Life cycle assessment of revalorization of lignocellulose for the development of biorefineries. **Environment, Development And Sustainability**, [S.L.], p. 1-32, 12 maio 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10668-023-03360-4>.

BERISIO, Rita; BARRA, Giovanni; ROMANO, Maria; SQUEGLIA, Flavia; RUGGIERO, Alessia. Structural and Biochemical Characterization of Endo- β -1,4-glucanase from *Dictyoglomus thermophilum*, a Hyperthermostable and Halotolerant Cellulase. **Catalysts**, [S.L.], v. 12, n. 3, 7 mar. 2022. <http://dx.doi.org/10.3390/catal12030302>.

BERNI, M. D.; MANDUCA, P. C. Oportunidades da valorização de resíduos sólidos da colheita, processamento e torrefação do grão de café no brasil. **Resultados das Pesquisas e Inovações na Área das Engenharias 2**, p. 8-21, 5 out. 2020.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, n. 2, p. 93–99, 1987.

BRADFORD, M. M.. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* v. 254, p. 248–254, maio. 1976.

BRULE, T.; PUNT, M.; TEERTSTRA, W.; HOUBRAKEN, J.; WÖSTEN, H.; DIJKSTERHUIS, J.. The most heat-resistant conidia observed to date are formed by distinct strains of *Paecilomyces variotii*. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 986-999, 24 out. 2019.

CAO, Yulian; LIU, Haifeng; SHAN, Junqiang; SUN, Baijun; CHEN, Yanjun; JI, Lei; JI, Xingxiang; WANG, Jian; ZHU, Chenjie; YING, Hanjie. Ammonia–Mechanical Pretreatment of Wheat Straw for the Production of Lactic Acid and High-Quality Lignin. **Fermentation**, [S.L.], v. 9, n. 2, 15 fev. 2023. <http://dx.doi.org/10.3390/fermentation9020177>.

CASTRO, A.C.C.M.; ODA, F.B.; ALMEIDA-CINCOTTO, M.G.J.; DAVANÇO, M.G.; CHIARI-ANDRÉO, B.G.; CICARELLI, R.M.B.; PECCININI, R.G.; ZOCOLO, G.J.; RIBEIRO, P.R.V.; CORRÊA, M.A.. Green coffee seed residue: a sustainable source of antioxidant compounds. **Food Chemistry**, v. 246, p. 48-57, abr. 2018.

CHEN, Wei-Hsin *et al.* Liquid hot water as sustainable biomass pretreatment technique for bioenergy production: a review. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 344, jan. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126207>.

CECAFE - CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL. **Relatório mensal abril 2023**. Abr. 2023. Disponível em: <https://www.cecafe.com.br/publicacoes/relatorio-de-exportacoes/>.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira** v. 10, safra 2023, n. 2, Segundo levantamento, Brasília, DF, p. 1-44, maio 2023.

COSGROVE, Daniel J. *et al.* Diffuse Growth of Plant Cell Walls. **Plant Physiology**, [S.L.], v. 176, n. 1, p. 16-27, 14 nov. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.17.01541>.

CROWELL, Andrew M.J.; WALL, Mark J.; DOUCETTE, Alan A.. Maximizing recovery of water-soluble proteins through acetone precipitation. **Analytica Chimica Acta**, [S.L.], v. 796, p. 48-54, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.08.005>.

CURRY, Thomas M. *et al.* An update on xylan structure, biosynthesis, and potential commercial applications. **The Cell Surface**, [S.L.], v. 9, p. 1-4, dez. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcs.w.2023.100101>.

DEVI, Arti; BAJAR, Somvir; KOUR, Havleen; KOTHARI, Richa; PANT, Deepak; SINGH, Anita. Lignocellulosic Biomass Valorization for Bioethanol Production: a circular bioeconomy approach. **Bioenergy Research**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 1820-1841, 7 fev. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12155-022-10401-9>.

DUONG, B.; MARRACCINI, P.; MAEGHT, Jean-Luc; VAAST, P.; LEBRUN, M.; DUPONNOIS, R. Coffee Microbiota and Its Potential Use in Sustainable Crop Management. A Review. **Frontiers In Sustainable Food Systems**, v. 4, n. 1, p. 1-31, 3 dez. 2020.

DURÁN, C. A. A.; TSUKUI, A.; SANTOS, F. K. F. dos; MARTINEZ, S. T.; BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M. de. Coffee: General aspects and its use beyond drink. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 107–134, Jan.-Fev. 2017.

EMBRAPA. **Safra dos Cafés do Brasil totaliza 50,92 milhões de sacas de 60kg de café em 2022.** 2022. Disponível em: http://www.consorciopesquisacafe.com.br/images/stories/noticias/2021/2022/dezembro/4_levantamento_safr_conab.pdf. Acesso em: 10 jun. 2023.

ESAWY, Mona A.; GAMAL, Amira A.; KAMEL, Zeinat. Optimization of *Aspergillus niger* NRC1ami Pectinase Using Citrus Peel Pectin, Purification, and Thermodynamic Characterization of the Free and Modified Enzyme. **Waste And Biomass Valorization**, [S.L.], v. 13, n. 12, p. 4823-4837, 23 jun. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-022-01838-2>.

FERREIRA, Viviani; SILVA, Roberto da; SILVA, Dênis; GOMES, Eleni. Production of Pectate Lyase by *Penicillium viridicatum* RFC3 in Solid-State and Submerged Fermentation. **International Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 2010, p. 1-8, 2010. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/276590>.

FRANÇA, P. R. L. de. **Degradação de pectina em suco de caju por poligalacturonase de *Aspergillus aculeatus* URM4953 imobilizada covalentemente em pérolas de alginato.** 2018. 100 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, 2018.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **GRAS Notices**. 2021. Disponível em: <https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>. Acesso em: 21 abr. 2021.

GHARECHAHI, Javad; VAHIDI, Mohammad Farhad; SHARIFI, Golandam; ARIAEENEJAD, Shohreh; DING, Xue-Zhi; HAN, Jian-Lin; SALEKDEH, Ghasem Hosseini. Lignocellulose degradation by rumen bacterial communities: new insights from metagenome analyses. **Environmental Research**, [S.L.], v. 229, jul. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2023.115925>.

GAO, C.; TELLO, E.; PETERSON, D. G.. Identification of coffee compounds that suppress bitterness of brew. **Food Chemistry**, v. 350, p. 1-9, jul. 2021.

GUAN, Yi; WANG, Donghuang; LV, Chao; ZHANG, Yuewen; GELBIC, Ivan; YE, Xiuyun. Archives of microbiology: screening of pectinase-producing bacteria from citrus peel and characterization of a recombinant pectate lyase with applied potential. **Archives Of Microbiology**, [S.L.], v. 202, n. 5, p. 1005-1013, 13 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-020-01807-0>.

GUIMARÃES, Nelciele Cavalieri de Alencar *et al.* Production and Biochemical Characterization of *Aspergillus japonicus* Pectinase Using a Low-Cost Alternative Carbon Source for Application in the Clarification of Fruit Juices. **Waste And Biomass Valorization**, [S.L.], p. 1-10, 22 maio 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-023-02171-y>.

GU, Haofeng; LIANG, Lei; ZHU, Xin Peng; JIANG, Xinhua; DU, Min; WANG, Zichao. Optimization of enzymatic extraction, characterization and bioactivities of Se-polysaccharides from Se-enriched *Lentinus edodes*. **Food Bioscience**, [S.L.], v. 51, fev. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102346>.

HALDER, Pobitra; KUNDU, Sazal; PATEL, Savankumar; SETIAWAN, Adi; ATKIN, Rob; PARTHASARTHY, Rajarathinam; PAZ-FERREIRO, Jorge; SURAPANENI, Aravind; SHAH, Kalpit. Progress on the pre-treatment of lignocellulosic biomass employing ionic liquids. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 105, p. 268-292, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.052>.

HAZEENA, Sulfath Hakkim; SINDHU, Raveendran; PANDEY, Ashok; BINOD, Parameswaran. Lignocellulosic bio-refinery approach for microbial 2,3-Butanediol production. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 302, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122873>.

HEJNA, A.. Potential applications of by-products from the coffee industry in polymer technology – Current state and perspectives. **Waste Management**, v. 121, p. 296-330, fev. 2021.

HOSEINI, M.; COCCO, S.; CASUCCI, C.; CARDELLI, V.; CORTI, G. Coffee by-products derived resources. A review. **Biomass And Bioenergy**, v. 148, maio 2021.

HOUSTON, Kelly; TUCKER, Matthew R.; CHOWDHURY, Jamil; SHIRLEY, Neil; LITTLE, Alan. The Plant Cell Wall: a complex and dynamic structure as revealed by the responses of genes under stress conditions. **Frontiers In Plant Science**, [S.L.], v. 7, p. 1-18, 10 ago. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2016.00984>.

HSIEH, Yves; HARRIS, Philip. Xylans of Red and Green Algae: what is known about their structures and how they are synthesised?. **Polymers**, [S.L.], v. 11, n. 2, 18 fev. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym11020354>.

JALIL, Mohd Taufiq Mat; ZAKARIA, Nurul Aili; SALIKIN, Nor Hawani; IBRAHIM, Darah. Assessment of cultivation parameters influencing pectinase production by *Aspergillus niger* LFP-1 in submerged fermentation. **Journal Of Genetic Engineering And Biotechnology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-13, 24 abr. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s43141-023-00510-z>.

KANG, X.; ZHANG, Yi; LIN, R.; LI, L.; ZHEN, F.; KONG, X.; SUN, Y.; YUAN, Z.. Optimization of liquid hot water pretreatment on Hybrid Pennisetum anaerobic digestion and its effect on energy efficiency. **Energy Conversion And Management**, v. 210, abr. 2020.

KHAMASSI, Ahmed; DUMON, Claire. Enzyme synergy for plant cell wall polysaccharide degradation. **Essays In Biochemistry**, [S.L.], v. 67, n. 3, p. 521-531, abr. 2023. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/ebc20220166>.

KLINGEL, T.; KREMER, J. I.; GOTTSTEIN, V.; REZENDE, T. R. de; SCHWARZ, S.; LACHENMEIER, D. W.. A Review of Coffee By-Products Including Leaf, Flower, Cherry, Husk, Silver Skin, and Spent Grounds as Novel Foods within the European Union. **Foods**, v. 9, n. 5, maio. 2020.

KORSA, Gamachis; KONWARH, Rocktotpal; MASI, Chandran; AYELE, Abate; HAILE, Setegn. Microbial cellulase production and its potential application for textile industries. **Annals Of Microbiology**, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 1-21, 10 abr. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13213-023-01715-w>.

KOTULA, Martyna; KUBIAK, Anita; LEŚNIEWSKI, Bartosz; PAJEWSKA-SZMYT, Martyna. Carbonization of Selected Biological Materials, Trends, and Perspectives. **Letters In Applied Nanobioscience**, [S.L.], v. 12, n. 3, 18 abr. 2022. AMG Transcend Association. <http://dx.doi.org/10.33263/lianbs123.068>.

LAGUNA, I. H. B. de; MARANTE, F.J. T.; MIOSO, R.. Enzymes and bioproducts produced by the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 119, n. 6, p. 1455-1466, 22 set. 2015.

LAEMMLI, U. K.. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, ago. 1970.

LESZCZUK, Agata; KALAITZIS, Panagiotis; KULIK, Joanna; ZDUNEK, Artur. Review: structure and modifications of arabinogalactan proteins (agps). **Bmc Plant Biology**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 1-12, 20 jan. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-023-04066-5>.

LI, Tao; LIU, Ping; GUO, Gege; LIU, Zhaoxing; ZHONG, Lei; GUO, Lianxia; CHEN, Cheng; HAO, Ning; OUYANG, Pingkai. Production of acetoin and its derivative tetramethylpyrazine from okara hydrolysate with *Bacillus subtilis*. **Amb Express**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-13, 28 fev. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-023-01532-z>.

OIC- ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ. **Relatório sobre o mercado de café: Abril de 2023.** Abr. 2023. Disponível em: <https://www.icocoffee.org/documents/cy2022-23/cmr-0423-e.pdf>

OELMÜLLER, Ralf; TSENG, Yu-Heng; GANDHI, Akanksha. Signals and Their Perception for Remodelling, Adjustment and Repair of the Plant Cell Wall. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 8, 18 abr. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24087417>.

MARđETKO, Nenad; TRONTEL, Antonija; NOVAK, Mario; PAVLEčIć, Mladen; LJUBAS, Blanka Didak; GRUBIćIć, Marina; TOMINAC, Vlatka Petravić; LUDWIG, Roland; IANTEK, Božidar. Screening of Lignocellulolytic Enzyme Activities in Fungal Species and Sequential Solid-State and Submerged Cultivation for the Production of Enzyme Cocktails. **Polymers**, [S.L.], v. 13, n. 21, 28 out. 2021. <http://dx.doi.org/10.3390/polym13213736>.

MARKET RESEARCH STORE. **Global Pectinase Market Report 2019.** 2019. Disponível em: <https://www.marketresearchstore.com/report/global-pectinase-market-report-2019-694535>. Acesso em: 19 abr. 2021.

MENDONÇA, Mauro; BARROCA, Mário; COLLINS, Tony. Endo-1,4-β-xylanase-containing glycoside hydrolase families: characteristics, singularities and similarities. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 65, jul. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023>.

MILLER, G. L.. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, mar. 1959.

MORENO-GAVÍRA, Alejandro; HUERTAS, Victoria; DIÁNEZ, Fernando; SÁNCHEZ-MONTESINOS, Brenda; SANTOS, Mila. Paecilomyces and Its Importance in the Biological Control of Agricultural Pests and Diseases. **Plants**, [S.L.], v. 9, n. 12, 10 dez. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants9121746>.

MORO, Mariana Kuster. **Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-rosca**. 2015. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

NADHIFAH, Hana; RAHMANI, Nanik; MANGUNWARDYO, Wibowo; YOPI; ATIKANA, Akhirta; RATNAKOMALA, Shanti; LISDIYANTI, Puspita. Xylanopectinolytic enzymes by marine actinomycetes from sediments of Sarena Kecil, North Sulawesi: high potential to produce galacturonic acid and xylooligosaccharides from raw biomass. **Journal Of Genetic Engineering And Biotechnology**, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 1-11, 15 mar. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s43141-023-00488-8>.

NCBI - National Center For Biotechnology. **Paecilomyces maximus**. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>. Acesso em: 05 maio 2023.

NSUDE, Chukwunonso Anthony; EZIKE, Tobechukwu Christian; LINUS, Ezugwu Arinze; EJE, Ozoemena Emmanuel; ONWURAH, Ikechukwu N e; CHILAKA, Ferdinand C. Kinetics and Thermodynamic Properties of Pectinase Obtained from *Trichoderma longibrachiatum* MT321074. **Tropical Journal Of Natural Product Research**, [S.L.], v. 6, n. 12, p. 2063-2072, dez. 2022.

NISHA, M.K. Efficacy of purified pectinase obtained from *paecilomyces variotii* in extraction and clarification of juice From grapes and pomegranate fruits. **International Journal Of Pharma And Bio Sciences**, v. 7, n. 4, p. 479-484, 17 out. 2016.

PANWAR, Deepesh; SHUBHASHINI, A.; KAPOOR, Mukesh. Complex alpha and beta mannan foraging by the human gut bacteria. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 66, set. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023>.

PEDROLLI, 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, n. 1, p. 9-18, 19 mar. 2009.

PELÁEZ, Rubén Darío Romero; WISCHRAL, Daiana; MENDES, Thais Demarchi; PACHECO, Thályta Fraga; URBEN, Arailde Fontes; HELM, Cristiane Vieira; MENDONÇA,

Simone; BALAN, Venkatesh; SIQUEIRA, Felix Gonçalves de. Co-culturing of micro- and macro-fungi for producing highly active enzyme cocktail for producing biofuels. **Bioresource Technology Reports**, [S.L.], v. 16, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biteb.2021>.

PEREIRA, P. V.; SILVEIRA, D. L. da; SCHWAN, R. F.; SILVA, S. A.; COELHO, J. M.; BERNARDES, P. C.. Effect of altitude and terrain aspect on the chemical composition of *Coffea canephora* cherries and sensory characteristics of the beverage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, set, 2020.

PEREIRA, P. V.; BRAVIM, D. G.; GRILLO, R. P.; BERTOLI, L. D.; OSÓRIO, V. M.; OLIVEIRA, D. da S.; MIGUEL, M. G. da C. P.; SCHWAN, R. F.; SILVA, S. de A.; COELHO, J. M. Microbial diversity and chemical characteristics of *Coffea canephora* grown in different environments and processed by dry method. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 1-12, 17 fev. 2021.

PEIXOTO, J. de Sá G. **Bioprospeção de fungos produtores de enzimas lignocelulolíticas e identificação de novas proteínas auxiliares para aplicação na conversão de biomassa lignocelulósica**. 2019. 175 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologias Química e Biológica, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

PIMENTA, C. J.; ANGÉLICO, C. L.; CHALFOUN, S. M. Challenges in coffee quality: cultural, chemical and microbiological aspects. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 4, p. 337-349, ago. 2018.

PITARELO, Ana Paula. **AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DO BAGAÇO E DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR À BIOCONVERSÃO VIA PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**. 2007. 143 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PHUONG, Do Viet; QUOC, Le Pham Tan; VAN TAN, Pham; DUY, Le Nguyen Doan. Production of bioethanol from Robusta coffee pulp (*Coffea robusta* L.) in Vietnam. **Foods And Raw Materials**, [S.L.], p. 10-17, 14 out. 2019. Kemerovo State University. <http://dx.doi.org/10.21603/2308-4057-2019-1-10-17>.

PUTRI, E; RUKAYADI, Y; SUNARTI, T C; A MERYANDINI,. Cellulolytic and Xylanolytic Actinomycetes selection to degrade Lignocellulosic biomass of Robusta coffee pulp (*Coffea canephora*). **Iop Conference Series: Earth and Environmental Science**, [S.L.], v. 299, n. 1, 1 jul. 2019. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/299/1/012014>.

RAO, Jun; LV, Ziwen; CHEN, Gegu; PENG, Feng. Hemicellulose: structure, chemical modification, and application. **Progress In Polymer Science**, [S.L.], v. 140, maio 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2023.101675>.

SANTI, L.; BERGER, M.; SILVA, W. O. B. da.. Pectinases e pectina : aplicação comercial e potencial biotecnológico. **Caderno pedagógico**, v. 11 n. 1, Lajeado, RS, p. 130–139, 2014.

SANTOS, E. M. dos; MACEDO, L. M. de; TUNDISI, L. L.; ATAIDE, J. A.; CAMARGO, G. A.; ALVES, R. C.; OLIVEIRA, M. B. P.P.; MAZZOLA, P. G.. Coffee by-products in topical formulations: a review. **Trends In Food Science & Technology**, v. 111, p. 280-291, maio 2021.

SHARMA, Surbhi; TSAI, Mei-Ling; SHARMA, Vishal; SUN, Pei-Pei; NARGOTRA, Parushi; BAJAJ, Bijender Kumar; CHEN, Chiu-Wen; DONG, Cheng-Di. Environment Friendly Pretreatment Approaches for the Bioconversion of Lignocellulosic Biomass into Biofuels and Value-Added Products. **Environments**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 6, 23 dez. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/environments10010006>.

SEMENOVA, M. V.; KURYSHKINA, M. S.; SINITSYN, A. P.. The Synergistic Interaction of Arabinases of Different Types of Action in the Bioconversion of Sugar Beet Pulp and Apple Pomace. **Applied Biochemistry And Microbiology**, [S.L.], v. 59, n. 2, p. 168-175, abr. 2023. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s0003683823020102>.

SERNA-LOAIZA, S.; ZIKELI, F.; ADAMCYK, J.; FRIEDL, A.. Towards a wheat straw biorefinery: combination of organosolv and liquid hot water for the improved production of sugars from hemicellulose and lignin hydrolysis. **Bioresource Technology Reports**, v. 14, jun. 2021.

SHUKLA, Akanksha; KUMAR, Deepak; GIRDHAR, Madhuri; KUMAR, Anil; GOYAL, Abhineet; MALIK, Tabarak; MOHAN, Anand. Strategies of pretreatment of feedstocks for optimized bioethanol production: distinct and integrated approaches. **Biotechnology For Biofuels And Bioproducts**, [S.L.], v. 16, n. 1, p. 1-33, 13 mar. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-023-02295-2>.

SINGH, A. K.; SHARMA, R. A Review on Sustainable Management of Coffee Industry By-Products. **Journal Of Critical Reviews**, Greater Noida, v. 7, n. 10, p. 686-691, maio 2020.

SRIVASTAVA, Pratibha; ANDERSEN, Peter C.; MAROIS, James J.; WRIGHT, David L.; SRIVASTAVA, Mrittunjai; HARMON, Philip F.. Effect of phenolic compounds on growth and ligninolytic enzyme production in *Botryosphaeria* isolates. **Crop Protection**, [S.L.], v. 43, p. 146-156, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.09.015>.

SUDEEP KC; UPADHYAYA, Jitendra; JOSHI, Dev Raj; LEKHAK, Binod; CHAUDHARY, Dhiraj Kumar; PANT, Bhoj Raj; BAJGAI, Tirtha Raj; DHITAL, Rajiv; KHANAL, Santosh; KOIRALA, Niranjana. Production, Characterization, and Industrial Application of Pectinase Enzyme Isolated from Fungal Strains. **Fermentation**, [S.L.], v. 6, n. 2, 9 jun. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/fermentation6020059>.

TARAFDAR, A.; SIROHI, R.; GAUR, V. K.; KUMAR, S.; SHARMA, P.; VARJANI, S; PANDEY, H. O.; SINDHU, R.; MADHAVAN, A.; RAJASEKHARAN, R.. Engineering interventions in enzyme production: lab to industrial scale. **Bioresource Technology**, v. 326, abr. 2021.

TINGLEY, J. P.; LOW, K. E.; XING, X.; ABBOTT, D. W.. Combined whole cell wall analysis and streamlined in silico carbohydrate-active enzyme discovery to improve biocatalytic conversion of agricultural crop residues. **Biotechnology For Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 1-19, 9 jan. 2021.

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

URQUHART, A. S.; MONDO, S. J.; MÄKELÄ, M. R.; HANE, J. K.; WIEBENGA, A.; HE, G.; MIHALTCHEVA, S.; PANGILINAN, J.; LIPZEN, A.; BARRY, K.. Genomic and Genetic Insights Into a Cosmopolitan Fungus, *Paecilomyces variotii* (Eurotiales). **Frontiers In Microbiology**, v. 9, p. 1-21, 13 dez. 2018.

VANHOLME, Ruben; MEESTER, Barbara de; RALPH, John; BOERJAN, Wout. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism. **Current Opinion In Biotechnology**, [S.L.], v. 56, p. 230-239, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.018>.

VOINICIUC, Cătălin; PAULY, Markus; USADEL, Björn. Monitoring Polysaccharide Dynamics in the Plant Cell Wall. **Plant Physiology**, [S.L.], v. 176, n. 4, p. 2590-2600, 27 fev. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.17.01776>.

XIAO, Li; YE, F.; ZHOU, Y.; ZHAO, G.. Utilization of pomelo peels to manufacture value-added products: a review. **Food Chemistry**, v. 351, p. 1-18, jul. 2021.

YADAV, Sangeeta; MAURYA, Sumeet Kumar; ANAND, Gautam; DWIVEDI, Ritika; YADAV, Dinesh. Purification and characterization of a highly alkaline pectin lyase from *Fusarium lateritium* MTCC 8794. **Biologia**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 245-251, mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1515/biolog-2017-0038>.

YADAV, Aditya; SHARMA, Vishal; TSAI, Mei-Ling; CHEN, Chiu-Wen; SUN, Pei-Pei; NARGOTRA, Parushi; WANG, Jia-Xiang; DONG, Cheng-Di. Development of lignocellulosic biorefineries for the sustainable production of biofuels: towards circular bioeconomy. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 381, ago. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129145>.

YANG, H.; SHI, Z.; XU, G.; QIN, Y.; DENG, J.; YANG, J. Bioethanol production from bamboo with alkali-catalyzed liquid hot water pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 274, p. 261-266, fev. 2019.

YANG, Haiyan; SHI, Zhengjun; XU, Gaofeng; QIN, Yongjian; DENG, Jia; YANG, Jing. Bioethanol production from bamboo with alkali-catalyzed liquid hot water

pretreatment. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 274, p. 261-266, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.088>.

ZHANG, Baocai; GAO, Yihong; ZHANG, Lanjun; ZHOU, Yihua. The plant cell wall: biosynthesis, construction, and functions. **Journal Of Integrative Plant Biology**, [S.L.], v. 63, n. 1, p. 251-272, jan. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jipb.13055>.

ZHUANG, J.; WANG, X.; XU, J.; WANG, Z.; QIN, M. Formation and deposition of pseudo-lignin on liquid-hot-water-treated wood during cooling process. **Wood Science And Technology**, v. 51, n. 1, p. 165-174, 21 out. 2016.

ZIELINSKI, M.; KISIELEWSKA, M.; DUDEK, M.; RUSANOWSKA, P.; NOWICKA, A.; KRZEMIENIEWSKI, M.; KAZIMIEROWICZ, J.; DEBOWSKI, M. Comparison of microwave thermohydrolysis and liquid hot water pretreatment of energy crop *Sida hermaphrodita* for enhanced methane production. **Biomass And Bioenergy**, v. 128, set. 2019.