



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS - TO  
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**ROZE ANNE FERREIRA LIMA**

**DESENVOLVIMENTO DE CULTURAS MISTAS PARA A PRODUÇÃO DE  
POLIGALACTURONASES BACTERIANAS ISOLADAS DE FRUTOS  
AMAZÔNICOS**

**Palmas - TO  
2024**

**Roze Anne Ferreira Lima**

**Desenvolvimento de culturas mistas para a produção de poligalacturonases bacterianas isoladas de frutos amazônicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins (UFT), como requisito à obtenção do grau de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Linha de pesquisa: Biotecnologia Aplicada a Indústria de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida

**Palmas – TO**

**2024**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

- L732d Lima, Roze Anne Ferreira.  
Desenvolvimento de culturas mistas para a produção de poligalacturonases bacterianas isoladas de frutos amazônicos. / Roze Anne Ferreira Lima. – Palmas, TO, 2024.  
69 f.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2024.  
Orientador: Alex Fernando de Almeida  
1. Poligalacturonase. 2. Bacillus sp. 3. Culturas mistas. 4. Carotenoides. I.  
Título

**CDD 664**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

**Roze Anne Ferreira Lima**

**Desenvolvimento de culturas mistas para a produção de poligalacturonases bacterianas isoladas de frutos amazônicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Foi avaliado para obtenção do título de Mestra em 20 de junho de 2024 e aprovada em forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 20 de junho de 2024

Banca Examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jamile Zeni, URI Erechim

---

Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales, UFT

---

Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida, Orientador - UFT

*Dedico este trabalho à minha mãe Deuzinete, às minhas irmãs Rose Kelly e Tállyta Victória, ao meu cunhado Wanthyeu ao meu sobrinho Anthony Gabriel a minha filha Eloá e ao meu esposo Leilson, que sempre estiveram ao meu lado.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que sempre esteve iluminando meu caminho ao longo da minha trajetória, dando-me força a cada dia para nunca desistir dos meus sonhos e seguir em frente.

Agradeço a minha Mãe Deuzinete e ao meu Pai Valdes por sempre estarem comigo e acreditarem em mim. Agradeço também as minhas irmãs, Rose Kelly e Tállyta Victória, meu cunhado e meu sobrinho Anthony Gabriel. Vocês foram essenciais!

Agradeço o meu esposo Leilson, por sempre me fazer sentir capaz de superar qualquer adversidade estando ao meu lado a 100%, por me apoiar incondicional em todos os momentos. Obrigada por ser o pilar da minha vida! Agradeço também a minha filha Eloá, um presente que ganhei ao longo da minha trajetória, que veio para abrilhantar mais ainda minha vida.

À Catarina, Larissa, Iara, Delma, Gabriela e Lorrane, que se tornaram mais que amigas nessa caminhada, sempre estiveram presente e foram meu alicerce em toda a pesquisa, dividimos surtos e gargalhadas, dia e noite, no laboratório, tornando tudo mais leve. Desejo que continuemos sempre uma ao lado da outra em todas as etapas da vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida por sempre estar disponível a me ajudar durante todo meu percurso, fazendo parte de toda minha trajetória. Obrigado pela pessoa e profissional que demonstrou ser. Foi um privilégio ser sua orientanda.

À Profa. Dra. Solange Cristina Carreiro por ter fornecido o laboratório, tornando possível a realização dos experimentos. Agradeço a parceria e dedicação do Prof. Dr. Sergio Villalba e da Profa. Dra. Michelle Abreu Cunha Xavier pelo laboratório cedido também para realização dos experimentos e também a todos laboratórios pelo qual passei. Um agradecimento mais que especial a Gabriela Eustaquio. Meu agradecimento também aos meninos do PIBIC, Thaís e Natanael pela companhia e troca de conhecimentos.

Agradeço a CAPES pela concessão de recursos de custeio para o desenvolvimento do Projeto PROCAD-AM 1707/2018 (Processo nº 88881.200497/2018-01).

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Tocantins (FAPT) pela concessão da bolsa de estudo por meio do Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação (PDPG) em parceria com a CAPES.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - PPGCTA - UFT e a Universidade Federal do Tocantins pela infraestrutura disponibilizada para a execução dos experimentos.

## RESUMO

As poligalacturonases são enzimas que degradam substâncias pécticas, quebrando as ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica dessas moléculas. Essas enzimas detêm várias aplicações biotecnológicas nas indústrias de alimentos, como a extração e clarificação de sucos de frutas e vinhos, extração de óleos essenciais, tratamento preliminar do suco de uva para indústrias vinícolas, amadurecimento das frutas, entre outros. Neste sentido, o trabalho teve como objetivo a produção e caracterização de poligalacturonase bacterianas isoladas de frutos amazônicos visando a sua aplicação na extração de carotenoides. Inicialmente, a produção de poligalacturonase foi analisada em cultivos contendo culturas puras de bactérias previamente selecionadas. As linhagens BCLB-640 e a BCLB-197A apresentaram atividade enzimática de 5,52 e 5,13 U/mL. Com esses resultados, uma cultura mista foi desenvolvida, sendo que a maior produção de poligalacturonase foi observada com a cultura mista BCLB-197A + BCLB-640 (14,68 U/mL). As enzimas produzidas em culturas puras e mistas foram caracterizadas quanto ao pH, temperatura e ions metálicos. A temperatura e pH reacional ótimos para quantificação da atividade enzimática foram de 50 °C e pH 5,0 para os três sistemas de cultivo analisados. A estabilidade frente ao pH mostrou que para as enzimas das linhagens BCLB-640 e BCLB-197A mantiveram o pH 5,0 e para a linhagem mista, BCLB-197A + BCLB-640 o pH ideal foi de 4,5. A presença de íons metálicos não apresentou efeitos positivos quando comparado com as amostras controle. A análise de extração de carotenoides mediante tomates demonstrou que as enzimas possuem potencial para aplicação tanto em culturas puras quanto em culturas mistas. Os resultados deste trabalho demonstram o potencial de aplicação de culturas puras e mistas de bactérias oriundas de frutos amazônicos na obtenção de poligalacturonases, assim como a aplicação destas enzimas na extração de carotenoides.

**Palavras-chave:** poligalacturonase, *Bacillus sp*, culturas mistas, culturas puras, carotenoides

## ABSTRACT

Polygalacturonases are enzymes that degrade pectic substances by breaking the glycosidic bonds along the carbon chain of these molecules. These enzymes have various biotechnological applications in the food industry, such as the extraction and clarification of fruit juices and wines, the extraction of essential oils, the preliminary treatment of grape juice for the wine industry, and fruit ripening, among others. The aim of this study was to produce and characterize bacterial polygalacturonases isolated from Amazonian fruits with a view to their application in the extraction of carotenoids. Initially, the production of polygalacturonase was analyzed in cultures containing pure cultures of previously selected bacteria. The BCLB-640 and BCLB-197A strains showed enzyme activity of 5.52 and 5.13 U/mL. With these results, a mixed culture was developed, and the highest production of polygalacturonase was observed with the BCLB-197A + BCLB-640 mixed culture (14.68 U/mL). The enzymes produced in pure and mixed cultures were characterized in terms of pH, temperature and metal ions. The optimum reaction temperature and pH for quantifying enzyme activity were 50 °C and pH 5.0 for the three cultivation systems analyzed. Stability in relation to pH showed that the enzymes from the BCLB-640 and BCLB-197A strains maintained pH 5.0 and for the mixed strain, BCLB-197A + BCLB-640, the ideal pH was 4.5. The presence of metal ions had no positive effects when compared to the control samples. The analysis of carotenoid extraction using tomatoes showed that the enzymes have potential for application in both pure and mixed cultures. The results of this work demonstrate the potential for applying pure and mixed cultures of bacteria from Amazonian fruits to obtain polygalacturonases, as well as the application of these enzymes in the extraction of carotenoids.

**Keywords:** polygalacturonase, *Bacillus sp.*, mixed cultures, pure cultures, carotenoids



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das poligalacturonases de acordo com seu modo de ação. ....	19
Tabela 2 - Continuação.....	20
Tabela 3 - Nomenclatura e classificação de enzimas. ....	23
Tabela 4 - Vantagens e desvantagens de métodos de extração de carotenoides. ....	29
Tabela 5 – Continuação. ....	30
Tabela 6 - Linhagens bacterianas utilizadas para a triagem de produção de poligalacturonases. .....	36
Tabela 7 - Linhagens bacterianas utilizadas na produção de poligalacturonases em culturas puras e culturas mistas. ....	37
Tabela 8 - Produção de poligalacturonases bacterianas em condições submersas.....	42
Tabela 9 - Continuação.....	43
Tabela 10 - Produção de poligalacturonases bacterianas com culturas puras e mistas realizados em cultivos submersos.....	44
Tabela 11 - Extração de carotenoides assistida por poligalacturonases produzidas por culturas puras de <i>B. siamensis</i> BCLB-640 e <i>B. amyloliquefaciens</i> BCLB-197A e cultura mista de BCLB-197A + BCLB-640. ....	56

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação das poligalacturonases .....	18
Figura 2. Nomenclatura das enzimas poligalacturonases .....	19
Figura 3 - Tucumã ( <i>Astrocaryum vulgare</i> Mart.), palmeira (A), fruto (B), fruto despulpado (C) e fruto demonstrando epicarpo, mesocarpo e endocarpo (D) .....	32
Figura 4 - Bacuparizeiro com frutos (A); Bacupari ( <i>Garcinia gardneriana</i> ) fruto maduro (B) .....	33
Figura 5. Redução do ácido dinitrossalicílico pelo açúcar redutor, formando o ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, dando origem ao ácido aldônico .....	39
Figura 6. Temperatura do meio reacional sobre as atividades de poligalacturonase das linhagens de <i>B. siamensis</i> BCLB-640, <i>B. amyloliquefaciens</i> BCLB-197A e BCLB-197A + BCLB-640 .....	46
Figura 7. Efeito do pH do meio reacional sobre a atividade de poligalacturonase das linhagens de <i>B. siamensis</i> BCLB-640, <i>B. amyloliquefaciens</i> BCLB-197A e BCLB-197A + BCLB-640 .....	47
Figura 8. Estabilidade térmica da poligalacturonase produzida a partir das linhagens de <i>B. siamensis</i> BCLB-640 (A), <i>B. amyloliquefaciens</i> BCLB-197A (B) e BCLB-197A + BCLB-640 (C) .....	49
Figura 9. Estabilidade frente ao pH da poligalacturonase produzida a partir das linhagens de <i>B. siamensis</i> - BCLB-640 (A), <i>B. amyloliquefaciens</i> - BCLB-197A (B) e BCLB-197A + BCLB-640 (C), respectivamente .....	51
Figura 10. Efeito dos íons metálicos na atividade de poligalacturonase produzida por <i>B. siamensis</i> - BCLB-640 (A), <i>B. amyloliquefaciens</i> - BCLB-197A (B) e BCLB-197A + BCLB-640 (C), respectivamente .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EC - Enzyme Commission

IUBMB - União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

PME - Pectina metil esterases

PAE - Pectina acetil esterase

PL - Pectato liases

PG - Poligalacturonases

GRAS - Geralmente reconhecido como seguro

CES - Cultivo em estado sólido

CS - Cultivo submerso

THF – Tetrahidrofurano

SE - Extração por solventes

MAE - Extração assistida por micro-ondas

EAU - Extração assistida por ultrassom

PLE - Extração líquida pressurizada

PEF - Extração de campo elétrico pulsado

PEFAE - Extração assistida em campo elétrico pulsado

SFE - Extração de fluidos supercríticos

EAE - Extração assistida por enzimas

MM - Meio mineral

NaOH - Hidróxido de sódio

DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico

U/mL – Unidade de enzima por mL

BCLB-640 - *Bacillus siamensis*

BCLB-197A - *Bacillus amyloliquefaciens*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Poligalacturonase</b>	<b>16</b>
2.1.1 Classificação e mecanismo de ação das poligalacturonases	17
2.1.2 Fontes de obtenção da enzima poligalacturonase	21
2.1.3 Produção de poligalacturonase	22
<b>2.2 Classificação das enzimas</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Culturas Mistas</b>	<b>23</b>
<b>2.4 Aplicação de poligalacturonase bacteriana</b>	<b>25</b>
2.4.1 Poligalacturonases ácidas	25
2.4.2 Poligalacturonases Alcalinas	26
<b>2.5 Extração de carotenoides</b>	<b>27</b>
2.5.1 Extração de carotenoides com poligalacturonases	30
<b>2.6 Frutos amazônicos</b>	<b>31</b>
2.6.1 Tucumã ( <i>Astrocaryum vulgare</i> Mart.)	31
2.6.2 Bacupari ( <i>Garcinia gardneriana</i> )	33
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Objetivos gerais</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	<b>35</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Microrganismos: manutenção e inóculo</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Cultivos dos microrganismos</b>	<b>37</b>
<b>4.3 Produção de poligalacturonases em cultivo submerso</b>	<b>37</b>
<b>4.4 Determinação da atividade de poligalacturonase</b>	<b>38</b>
<b>4.5 Caracterização bioquímica da poligalacturonase</b>	<b>39</b>
4.5.1 Efeito da temperatura do meio reacional sobre atividade enzimática	39
4.5.2 Efeito das concentrações de pH do meio reacional sobre a atividade enzimática	40
4.5.3 Estabilidade térmica de poligalacturonase	40
4.5.4 Estabilidade em pH	40
<b>4.5.5 Efeito dos íons metálicos na atividade da poligalacturonase</b>	<b>41</b>
<b>4.6 Tratamento enzimático para a extração de carotenoides</b>	<b>41</b>

<b>4.6.1</b>	<b>Análise de Carotenoides</b>	<b>41</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise estatística dos dados</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSÃO</b>	<b>42</b>
<b>5.1</b>	<b>Produção de poligalacturonase</b>	<b>42</b>
<b>5.2</b>	<b>Produção de poligalacturonases bacterianas em culturas mistas</b>	<b>43</b>
<b>5.3</b>	<b>Caracterização bioquímica da poligalacturonase de culturas puras e mistas</b>	<b>45</b>
5.3.1	Efeito da temperatura do meio reacional sobre atividade enzimática	45
5.3.2	Determinação do pH ótimo para a atividade de poligalacturonase	47
5.3.3	Estabilidade térmica de poligalacturonase	48
5.3.4	Estabilidade frente ao pH	50
5.3.5	Efeito dos íons metálicos na atividade da poligalacturonase	52
<b>5.4</b>	<b>Análise de Carotenoides</b>	<b>55</b>
<b>6.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as poligalacturonases são classificadas em três grupos conforme o seu mecanismo de ação: esterases – que catalisam a desesterificação da pectina pela remoção de resíduos de acetil e metoxila, resultando em ácido poligalacturônico. Elas são ainda subdivididas em pectina metil esterases (PME, E.C 3.1.1.11) e pectina acetil esterase (PAE, E.C 3.1.1.6). Protopectinases solubilizam a protopectina (encontrada na fruta verde) para formar pectina solúvel (encontrada na fruta madura). E as despolimerases quebram as ligações glicosídicas entre os resíduos galacturônicos via transeliminação (liases) (PL, E.C 4.2.2.2) (pectato liases e pectina liases) ou hidrólise (hidrolases) (PG, E.C 3.2.1.15) (exo ou endo – poligalacturonases) (VAZ et al., 2021). As pectinases são compostas principalmente por poligalacturonase (EC 3.2.1.15), pectina liase (EC 4.2.2.10) e pectina metil esterases, que degradam substâncias pécnicas presentes nas paredes celulares vegetais, reduzindo a viscosidade e clarificando suco de frutas (NAWAWI et al., 2022).

As enzimas são biomoléculas compostas por polímeros de aminoácidos que atuam como catalisadores, facilitando a conversão de substratos em produtos no metabolismo dos organismos vivos, exibindo alta especificidade (ALEXANDER et al., 2017). A maioria das enzimas são proteínas que podem atuar tanto no interior das células, denominadas enzimas intracelulares, como também serem secretadas, sendo denominadas enzimas extracelulares. Entre as enzimas extracelulares, as enzimas pectinolíticas formam uma classe que atuam sobre substâncias pécnicas, quebrando as ligações glicosídicas ao longo da cadeia carbônica dessas moléculas.

Embora existam outras fontes enzimáticas, como animais e plantas, a utilização de enzimas microbianas é a mais difundida, devido à alta taxa de crescimento na obtenção de biomassa, além de não serem afetadas por flutuações sazonais e, portanto, sendo mais economicamente viáveis (MANOOCHEHRI et al., 2020). Além disso, as enzimas microbianas têm uma ampla variedade de aplicações comerciais e são empregadas em diversos setores industriais, incluindo extração de suco e óleo, fermentação, alimentação animal, revestimento, tratamento de águas residuais, celulose e papel e indústrias farmacêuticas (OUMER, 2017; SHARMA; RATHORE; SHARMA, 2013).

As enzimas microbianas representam cerca de 25% das vendas globais de enzimas (OUMER; ABATE, 2018). No entanto, a produção de uma variedade de enzimas ao longo dos

anos tem sido explorada comercialmente. Em princípio, são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras (UZUNER; CEKMECELIOGLU, 2015). No entanto, diversas espécies de microrganismos, são reconhecidos como excelentes produtores de poligalacturonase em escala industrial, como *Aspergillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Fusarium*, *Bacillus*, dentre outros (REGO et al., 2021). Destaca-se especialmente, os fungos filamentosos, como o *Aspergillus niger*, o principal produtor de poligalacturonase ácida, amplamente usada nas indústrias de suco de frutas e vinho (REBELLO et al., 2017).

A diversidade do bioma brasileiro oferece uma vasta fonte de substâncias produzidas por microrganismos. A floresta amazônica ocupa uma área de 4.196.943 km<sup>2</sup> e corresponde a mais de 40% do território brasileiro, é constituída por uma floresta tropical. Além de ser conhecida mundialmente por sua grande biodiversidade, contendo aproximadamente 25% da biodiversidade global, desempenha um papel essencial no funcionamento do sistema terrestre (PAZ et al., 2018).

Muitas das frutas exóticas da Amazônia são normalmente colhidas na natureza ou cultivadas principalmente para o consumo local na forma de polpa ou *in natura*, resultando em um baixo valor agregado desses alimentos (PEREIRA et al., 2018). Entre as frutas amazônicas, destacam-se o bacupari e o tucumã. Atualmente, essas plantas têm recebido atenção especial da comunidade científica, sendo necessária a implementação de políticas públicas que incentivem o cultivo e a exploração sustentável dessas plantas (PANIC et al., 2019).

Além de apresentar propriedades nutricionais, as frutas têm grande importância como fonte de microrganismos com potencial para obtenção de microrganismos endofíticos. Endofíticos são combinações de microrganismos e plantas que vivem constantemente nas plantas, supostamente sem prejudicar seus hospedeiros. Comumente são localizados nas folhas, frutos, raízes, caules, flores e sementes. Esses microrganismos formam um grupo de interesse potencial para a criação de vários bioprodutos, como por exemplo, enzimas (VESPERMANN et al., 2017).

A produção de enzimas industriais é um importante pré-requisito para aplicações biotecnológicas de sucesso. A caracterização bioquímica das enzimas oferece informações que podem ser utilizadas para ajudar a melhorar a estabilidade e manutenção da atividade catalítica da enzima, por um maior período (YU; XU, 2018). As formas de produção e caracterização da poligalacturonase estão associadas ao cultivo submerso e em estado sólido. No cultivo submerso, os microrganismos são cultivados em meio líquido, enquanto na fermentação em estado sólido, ocorre o crescimento microbiano e a formação de produto sobre ou dentro de partículas de um substrato sólido. Neste sentido as enzimas são produzidas a partir de

realizações analíticas quanto ao pH, temperatura, tempo de incubação e especialidade do substrato (CHOWDHURY et al., 2017).

Os sistemas de cultura mista utilizam consórcios microbianos indefinidos, ao contrário das culturas puras que utilizam espécies microbianas definidas para a produção. As culturas mistas possuem uma alta taxa de evolução, proporcionando rendimentos favoráveis. Desempenha funções de transmitir sinais moleculares e comunicar-se entre si. Assim, a utilização de sistemas de cultura mista contribui para a utilização do substrato e para a eficiência da degradação em um ritmo mais rápido em comparação com sistemas de cultura pura (BAGHCHEHSARAEE et al., 2010).

Diante o exposto, as enzimas poligalacturonases são de grande importância para a indústria de alimentos, e a exploração de novas fontes de microrganismos produtores dessa enzima a partir dos frutos amazônicos, está em crescimento, podendo agregar valor em diversas aplicações biotecnológicas com futura aplicação comercial.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Poligalacturonase**

As poligalacturonases foram as primeiras enzimas industrialmente utilizadas, com suas aplicações descritas inicialmente em 1930. Nesta década, as indústrias de processamento de frutas começaram a produzir sucos, mas, os rendimentos eram baixos, e muitas dificuldades foram encontradas na extração, clarificação ou filtração do suco. Kertész e Mehrlitz foram os primeiros a descrever sobre a facilidade de filtragem de vários sucos após tratamento enzimático. Mas, apenas na década de 1960, o conhecimento acerca dos tecidos vegetais tornou-se evidente, permitindo a expansão no mercado de enzimas (KUMAR, 2015).

Os componentes estruturais de uma parede celular vegetal são polissacarídeos complexos, como a celulose, a hemicelulose, substâncias pécnicas e lignina (DANALACHE et al., 2018). A celulose e a hemicelulose fornecem resistência à parede celular, enquanto as substâncias pécnicas atuam como uma substância cimentante para a rede de celulose.

As pectinas são macromoléculas glicosídicas complexas de alta massa molecular que contribuem para processos fisiológicos como a diferenciação celular ou o crescimento celular, sendo em grande parte responsáveis pela integridade estrutural e coesão dos tecidos vegetais (SHARMA et al., 2006; NIGAM; PANDEY, 2009). Do ponto de vista químico, as pectinas são compostas principalmente por um esqueleto de unidades de ácido galacturônico, ligadas por



ligações  $\alpha$ -1-4-glicosídicas, onde os grupos carboxila são parcialmente esterificados por grupos metil ou parcialmente/totalmente neutralizados por sódio ou íons amônio e grupos hidroxila podem ser acetilados (SRIAMORNSAK, 2003).

Dependendo de sua forma química, as pectinas são classificadas como fibras solúveis ou insolúveis (não sendo absorvido pelo trato digestivo humano) (EASTWOOD, 1992). Estão presentes principalmente na forma de protopectina insolúvel em frutos verdes, que é transformada em pectina solúvel durante o amadurecimento. Protopectinases, que são enzimas naturais, responsáveis por essa modificação que envolve a quebra das cadeias pécticas, o que causa a maciez das frutas durante o amadurecimento (JAYANY; SEXANA, 2005).

### 2.1.1 Classificação e mecanismo de ação das poligalacturonases

As poligalacturonases ou enzimas pectinolíticas são um grupo complexo de enzimas que catalisam a degradação de várias substâncias pécticas (pectina). A classificação das poligalacturonases se dá pelo modo de ataque às moléculas dos polímeros pécticos; pela preferência pelo substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina); e na ação, seja ela por transeliminação ou hidrólise e por clivagem randômica (enzima endo) ou terminal (enzima exo). Existem basicamente três grupos principais de enzimas pectinolíticas (Figura 1): protopectinases, esterases e despolimerases (HAILE; AYELE, 2022; SATAPATHY et al., 2020).

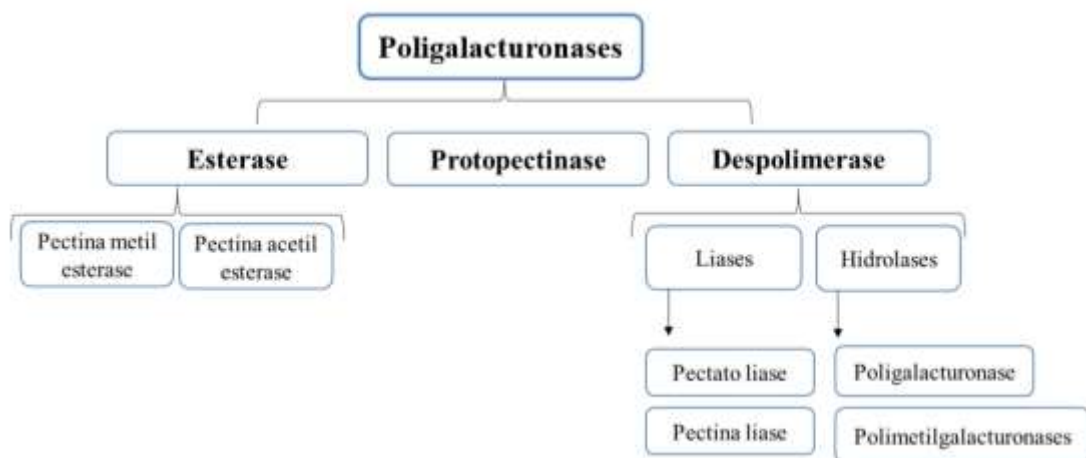
As esterases catalisam a desesterificação da pectina pela remoção de resíduos de acetil e metoxila, dando origem a ácido poligalacturônico. São subdividas em pectina metil esterases (PME, E.C 3.1.1.11) e pectina acetil esterase (PAE, E.C 3.1.1.6). Sua ação está preferencialmente no grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade não esterificada (Tabela 1) (KAYSHAP et al., 2001). Está presente em praticamente todas as preparações enzimáticas comerciais para proteção e melhoramento da textura e firmeza de frutas e vegetais processados e na extração e clarificação de sucos de frutas (UENOJO; PASTORE, 2007).

As protopectinases solubilizam a protopectina (encontrada na fruta verde) para formar pectina solúvel (encontrada na fruta madura). Catalisam a solubilização da protopectina, uma vez que degradam o substrato insolúvel produzindo uma pectina solúvel altamente polimerizada (TAPRE; JAIN, 2014). As protopectinases são classificadas em dois tipos, com base no seu mecanismo de reação (Tabela 1) (SAKAI; OKUSHIMA, 1982; SAKAMOTO; HOURS; SAKAI, 1994).). As do tipo A reagem com o sítio interno, ou seja, a região do ácido poligalacturônico da protopectina, enquanto as do tipo B reagem no local externo, ou seja, nas

cadeias polissacarídicas que podem conectar a cadeia do ácido poligalacturônico e os constituintes da parede celular. As do tipo A são encontradas nos filtrados de cultura de leveduras e fungos semelhantes a leveduras (JAYANY; SEXANA, 2005) e do tipo B também foram encontradas no filtrado de cultura de uma ampla gama de *Bacillus* sp. (SAKAI, 1992).

E as enzimas despolimerases quebram as ligações glicosídicas entre os resíduos galacturônicos via transeliminção (liases) (PL, E.C 4.2.2.2) (pectato liases e pectina liases) ou hidrólise (hidrolases) (PG, E.C 3.2.1.15) (exo ou endo – poligalacturonases). Atuam sobre substâncias pécticas por dois mecanismos diferentes, a hidrólise, na qual catalisam a clivagem hidrolítica com a introdução de água através da ponte de oxigênio e a liase trans-eliminatória, na qual quebram a ligação glicosídica por uma reação de transeliminção sem qualquer participação da molécula de água (Tabela 1) (KASHYAP et al., 2001; JAYANI et al., 2005; GARG et al., 2016; RAMADÃ, 2019). As despolimerases podem ser subdivididas em quatro categorias diferentes, dependendo da preferência da enzima pelo substrato, do mecanismo de clivagem e da divisão das ligações glicosídicas (Tabela 1) (JAYANY; SAXENA, 2005). Poligalacturonase e polimetilgalacturonase quebram pectato e pectina, respectivamente pelo mecanismo de hidrólise (Tabela 1). Dependendo do padrão de ação, ou seja, aleatória ou terminal, essas enzimas são denominadas enzimas Endo ou Exo, respectivamente. As endo-PGases estão amplamente distribuídas entre fungos, bactérias e muitas leveduras (LUH; PAFF, 1951), também são encontradas em plantas superiores e alguns nematoides parasitas de plantas (SAKAI et al., 1993). Em contraste, as exo-PGases ocorrem com menos frequência.

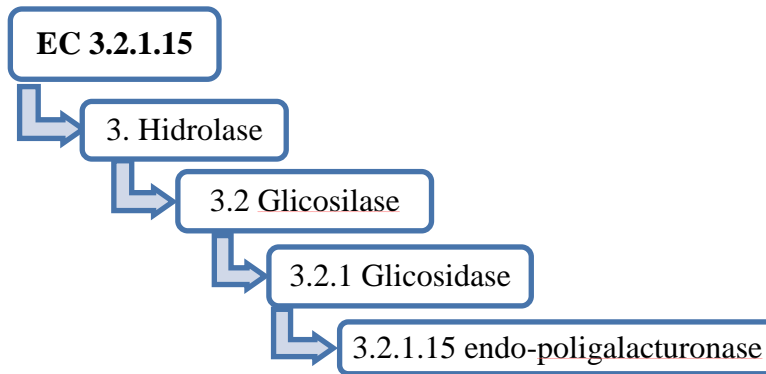
Figura 1. Classificação das poligalacturonases



Fonte: Próprio Autor, 2024.

O desmembramento da nomenclatura das enzimas poligalacturonases (EC 3.2.1.15) são representadas na Figura 2. Estas enzimas são enzimas amplamente distribuídas em bactérias, fungos e plantas (THAKUR et al., 2010).

Figura 2. Nomenclatura das enzimas poligalacturonases



Fonte: Próprio Autor, 2024.

As poligalacturonases são utilizadas em diversos processos industriais convencionais, não apenas na extração de sucos de frutas e clarificação, mas também no processamento têxtil, fermentação de café ou chá, recuperação de óleos vegetais, maceração/desgomagem de fibras vegetais e fabricação de papel (KASHYAP et al., 2001).

As enzimas pectinolíticas podem ser divididas em três grupos amplos (Tabela 1): as protopectinases, que degradam a protopectina insolúvel e dão origem a pectina solúvel altamente polimerizada; as esterases: catalisam a desesterificação da pectina pela remoção de ésteres metoxi; e as despolimerases, que catalisam a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  4) do ácido d-galacturônico das substâncias pécticas (JAYANY; SAXENA, 2005).

Tabela 1 - Classificação das poligalacturonases de acordo com seu modo de ação.

<b>Enzima</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Padrão de ação</b>	<b>Substrato primário</b>	<b>Produto</b>
Protopectinase	Hidrólise	Aleatório	Protopectina	Pectina
Esterase				
Pectina metil esterase	Hidrólise	Aleatório	Pectina	Ácido péctico + metanol
Pectina acetil esterase	Hidrólise	Aleatório	Pectina	Ácido péctico + metanol
Despolimerase				

Tabela 2 - Continuação.

<i>Hidrolases</i>				
Endopoligalacturonase	Hidrólise	Aleatório	Ácido péctico	Oligogalacturonatos
Exopoligalacturonase	Hidrólise	Terminal	Ácido péctico	Monogalacturonatos
Exopolygalacturonan-digalacturono hydrolase	Hidrólise	Penúltimo vínculo	Ácido péctico	Digalacturonatos
Oligogalacturonase hydrolase	Hidrólise	Terminal	Trigalacturonato	Monogalacturonatos
Endopolimetil-galacturonases	Hidrólise	Aleatório	Pectina altamente esterificada	Oligometilgalacturonatos
Endopolimetil-galacturonases	Hidrólise	Terminal	Pectina altamente esterificada	Oligogalacturonatos
<i>Liases</i>				
Endopoligalacturonase liase	Trans-eliminação	Aleatório	Ácido péctico	Oligogalacturonatos insaturados
Exopoligalacturonase liase	Trans-eliminação	Penúltimo vínculo	Ácido péctico	Digalacturonatos insaturados
Oligo-d-galactosiduronato liase	Trans-eliminação	Terminal	Digalacturonatos insaturados	Monogalacturonatos insaturados
Endopolimetil-d-galactosiduronato liase	Trans-eliminação	Aleatório	Poli-(metil-d-digalacturonatos) insaturados)	Metiloligogalacturonatos insaturados
Exopolimetil-d-galactosiduronato liase	Trans-eliminação	Terminal	Poli-(metil-d-digalacturonatos) insaturados)	Metilmonogalacturonatos insaturados

Fonte: Jayani; Saxena, 2005; Siero et al., 2012.

As poligalacturonases podem ser classificadas de acordo com a preferência do substrato utilizado, podendo atuar em pectina, ácido péctico, protopectina ou oligo-D-galacturonato. De acordo com o mecanismo de clivagem, as poligalacturonases podem ser chamadas de despolimerases ou esterases. Essas enzimas podem ainda ser nomeadas de acordo com o modo de ação; se hidrolisarem o substrato aleatoriamente, são endoenzimas, que levam à liquefação e despolimerização; se hidrolisam a partir das extremidades, são exoenzimas de sacarificação (BHARDWAJ et al., 2017).

### 2.1.2 Fontes de obtenção da enzima poligalacturonase

Cerca de 4.000 enzimas são conhecidas atualmente, mas somente aproximadamente apenas 5% deste total são utilizadas comercialmente, geralmente de origem microbiana, sendo que as enzimas produzidas por fungos são as mais importantes na indústria. Deste total, 75% destas enzimas pertencem ao grupo das hidrolases, consideradas as enzimas com maior importância industrial atualmente, e destas enzimas, 90% são produzidas por microrganismos (BANERJEE; RAY, 2017; LIU; KOKARE, 2017; SINGH; SINGH; PANDEY, 2019).

As enzimas pectinolíticas podem ser obtidas a partir de diferentes microrganismos, como leveduras, bactérias, actinomicetos e, principalmente, por fungos filamentosos que são considerados um dos mais eficazes produtores de poligalacturonases (JAHAN et al., 2017; SIEIRO et al., 2012). Das enzimas industriais produzidas a partir de microrganismos, 50% são originárias de fungos e leveduras, 35% de bactérias, enquanto os 15% restantes são de origem vegetal (OUMER, 2017).

As poligalacturonases fúngicas são enzimas extracelulares, nas quais a poligalacturonase é o tipo mais relevante entre elas. São produzidas por diferentes fungos, incluindo *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp., *Rhizomucor* spp., *Aureobasidium* spp., *Thermotoga* spp., *Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Pichia* spp., *Kluyveromyces* spp., e bactérias como *Bacillus* spp., *Klebsiella* spp., e *Pseudomonas* spp., têm sido documentadas como produtoras de pectinases alcalinas (KAVUTHODI; SEBASTIAN, 2018; PATIDAR et al., 2018; RUIZ et al., 2017; JAYANI et al., 2005).

Geralmente, as enzimas pectinolíticas derivadas de fungos são ácidas, enquanto as enzimas alcalinas são secretadas principalmente por linhagens bacterianas. *Aspergillus* spp. são o gênero de fungo mais comum utilizado para a produção industrial de poligalacturonases e apresenta diferenças consideráveis entre as espécies quanto à especificidade do substrato, taxa de clivagem, pH ótimo e temperatura para sua atividade (RUIZ et al., 2017; FAVELA-TORRES et al., 2006). As poligalacturonases de *Aspergillus niger* são amplamente utilizadas nas indústrias, pois esta cepa possui o GRAS (Geralmente reconhecido como seguro), o que significa que os metabólitos produzidos por esta cepa podem ser usados com segurança. Esta cepa fúngica produz várias poligalacturonases, incluindo polimetilgalacturonase, poligalacturonase e pectinesterase (JOSHI et al., 2015).

Na literatura são encontrados diferentes isolados bacterianos com potencial para produção de enzimas pectinolíticas. As linhagens de *Bacillus* foram selecionadas como os produtores enzimáticos mais potente (SOHAIL; LATIF, 2016; KAVUTHODI; SEBASTIAN,

2018). A espécie *Bacillus amyloliquefaciens* é Gram-positiva, formadora de endósporos e em forma de bastonete. Taxonomicamente, a espécie pertence ao complexo de espécies *Bacillus subtilis*, família Bacillaceae, e classe Bacilli. Até o momento, o grupo *B. amyloliquefaciens* compreende quatro espécies bacterianas: *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus velezensis* e *Bacillus nakamurai*. Eles são amplamente distribuídos no solo, plantas, alimentos e água (NGALIMAT et al., 2021).

Estudos demonstraram que as bactérias produzem poligalacturonases resistentes ao pH e temperatura elevados (HOONDAL et al., 2002; ANDRADE et al., 2011). Contudo, reportam ainda que as cepas bacterianas produtoras de enzimas comerciais são sempre preferidas, porém, às cepas fúngicas como *Aspergillus niger* são mais utilizadas para a produção comercial de poligalacturonase devido à facilidade do processo de fermentação (para produção) e implementação de técnicas de melhoramento de cepas ou qualquer técnica para aumentar o rendimento da produção (PRATHYUSHA; SUNEETHA, 2011), devido a pouca exigência de substrato e facilidade no cultivo. Além disso, as poligalacturonases bacterianas a produção é alcançada em menos tempo em comparação com fontes fúngicas (JOSHI et al., 2015).

### 2.1.3 Produção de poligalacturonase

Para a produção de poligalacturonases a partir de microrganismos existem duas técnicas de cultivos denominadas cultivos em estado sólido (CES) e cultivos submersos (CS). CES é definido como o cultivo de microrganismos em suportes sólidos húmidos, quer em suportes inertes carreadores ou em substratos insolúveis que podem ser usados como carbono e fonte de energia. Este processo ocorre na ausência ou quase ausência de água livre no espaço entre o substrato partículas. Neste sistema, a água está presente no substrato sólido cuja capacidade de retenção de líquidos varia com o tipo de material (OUMER, 2017; PANDEY et al., 2000). Em contraste, no CS os nutrientes e microrganismos estão ambos submersos na água. Aproximadamente 90% de todas as enzimas industriais são produzidas em CS, frequentemente, usando microrganismos manipulados geneticamente (OUMER, 2017).

## 2.2 Classificação das enzimas

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), definiu critérios para denominação e classificação de enzimas, onde à cada enzima é atribuído um código de 4 números separados por pontos (W.X.Y.Z), precedido das iniciais EC (Enzyme Commission). Os números W, X e Y referem-se à classe, subclasse e sub-subclasse das enzimas,

respetivamente, e o número Z refere-se ao ordenamento da enzima dentro da sub-sub-classe (FAROOQ et al., 2021; PINTO, 2008).

A classificação divide as enzimas em seis classes distintas de acordo com o tipo de reação que catalisam, como apresentado na Tabela 3. As enzimas são classificadas em seis classes: oxi-redutases (classe 1), transferases (classe 2), hidrolases (classe 3), liases (classe 4), isomerases (classe 5) e ligases/sintetases (classe 6). Esta classificação proposta é organizada a partir do tipo funcional da enzima, de forma que diferentes proteínas, mesmo que com estruturas diferentes, porém com uma mesma atividade catalítica (isozimas), possuem o mesmo nome e o mesmo número de EC.

Tabela 3 - Nomenclatura e classificação de enzimas.

<b>Primeiro Número (classe)</b>	<b>Classe de Enzima</b>	<b>Tipo de reação Catalisada</b>
1	Oxirredutases	Reações de oxirredução
5	Transferases	Transferência de grupos entre moléculas
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liases	Remoção de um grupo de uma molécula
5	Isomerases	Reações de isomerização
6	Ligases	Reações de síntese acopladas à hidrólise de uma molécula de ATP

Fonte: Farooq et al., (2021) adaptada pela autora.

Nas reações catalisadas pelas hidrolases (EC 3.X.Y.Z), os reagentes são a água e o substrato, que se rompe em suas partes constituintes, a catálise ocorre nas reações de clivagem pela adição de uma molécula de água à ligações covalentes tais como as ligações do tipo C-C, C-O, C-N e O-P e, no geral, quando um composto tem o sufixo “ase”, a enzima se trata de uma hidrolase (amilase, lipase, celulase, pectinase, quitinase, protease, etc) e elas quase sempre catalisam reações fisiologicamente irreversíveis.

### 2.3 Culturas Mistas

Culturas mistas referem-se ao cultivo simultâneo de dois ou mais microrganismos diferentes em um mesmo ambiente. A coexistência desses microrganismos pode resultar em

interações sinérgicas que beneficiam processos biotecnológicos, como a produção de enzimas como a poligalacturonase (AMIN et al., 2019).

A adoção de culturas mistas na produção de poligalacturonase apresenta diversas vantagens, dentre elas, de potencializar a eficiência da produção. Essa abordagem permite a otimização de processos biotecnológicos complexos (SHRESTHA et al., 2021), além da capacidade de utilizar microrganismos com funções complementares que podem levar a um aumento substancial na qualidade e rendimento da poligalacturonase (HAILE et al., 2022).

O processo de seleção dos microrganismos para culturas mistas é crucial para o sucesso da produção de poligalacturonase, que envolve a escolha de linhagens que possuam a capacidade de produzir diferentes tipos de poligalacturonase ou que apresentem sinergia metabólica (HAILE et al., 2022; SHRESTHA et al., 2021). A combinação estratégica de microrganismos complementares desempenha um papel fundamental na eficácia da cultura mista. A interação entre os microrganismos em uma cultura mista é altamente dinâmica e multifacetada. Ela engloba a troca de metabólitos benéficos, a competição por recursos e a comunicação celular. Esses processos colaborativos desempenham um papel fundamental na eficiência e estabilidade da produção de poligalacturonase (AMIN et al., 2019).

Comparadas às culturas puras, as culturas mistas oferecem uma série de vantagens notáveis. Elas demonstram uma maior estabilidade ao longo do processo produtivo, sendo capazes de utilizar substratos complexos de forma mais eficaz (PACHAPUR et al., 2019). Além disso, essa abordagem pode resultar em uma redução significativa na geração de resíduos, contribuindo para a sustentabilidade do processo.

As culturas mistas possuem rendimentos termodinamicamente favoráveis com configurações de cultivos simples, devido a sua alta taxa de evolução de hidrogênio. A cultura mista desempenha duas funções principais: transmitir sinais moleculares e comunicar-se entre si usando metabólitos (PACHAPUR et al., 2019), contribuindo para a divisão do trabalho para a fácil e rápida degradação do substrato complexo. Assim, o uso de sistemas de cultura mista auxilia na utilização do substrato e na eficiência de degradação em uma taxa mais rápida em comparação com sistemas de cultivo puro/co-cultivo (BAGHCHEHSARAEE et al., 2010).

Desenvolver e controlar culturas mistas apresenta desafios únicos. É necessário implementar estratégias para monitorar e ajustar as condições de cultivo, garantindo um ambiente propício para a interação sinérgica entre os microrganismos. A manutenção de condições ideais é essencial para maximizar a produção de poligalacturonase (HAILE et al., 2022). As culturas mistas têm demonstrado sucesso em diversas aplicações industriais na produção de poligalacturonase. Setores como a indústria de alimentos, produção de bebidas e



indústrias de bioprocessos têm se beneficiado significativamente dessa abordagem, resultando em processos mais eficientes e econômicos (BAGHCHEHSARAEE et al., 2010).

A aplicação de técnicas de engenharia genética e biologia sintética pode potencializar ainda mais o desempenho das culturas mistas na produção de poligalacturonase. A manipulação genética pode ser empregada para otimizar a produção de enzimas e melhorar a sinergia metabólica entre os microrganismos (AMIN et al., 2019).

O campo das culturas mistas na produção de poligalacturonase tem um futuro promissor. A integração de abordagens avançadas, como a aplicação de inteligência artificial para otimização de processos, promete impulsionar ainda mais a eficiência e aplicabilidade dessa técnica. Espera-se uma expansão contínua das aplicações industriais, consolidando as culturas mistas como uma ferramenta indispensável na produção de enzimas de interesse biotecnológico (PACHAPUR et al., 2019).

## **2.4 Aplicação de poligalacturonase bacteriana**

### **2.4.1 Poligalacturonases ácidas**

As poligalacturonases ácidas são geralmente utilizadas na indústria de sucos e vinhos. Enzimas ácidas são úteis na extração e clarificação de suco de frutas tropicais, fabricação de purês de frutas, em produtos de laranja e clarificação de vinhos (TAPRE; JAIN, 2014). As poligalacturonases são pré-requisito na clarificação do suco porque não só reduzem o amargor e a turvação dos sucos de frutas, mas também reduzem a viscosidade, melhoram a prensabilidade da polpa e desintegram a geleia como a pectina (SANDRI et al., 2012).

O tratamento com poligalacturonase tem sido realizado com diferentes tipos de frutas, como morango, framboesa, amora, bagaço de maçã, suco de laranja e suco de uva e resultou em melhor cromaticidade e estabilidade dos vinhos (PASHA et al., 2013).

Na viticultura e vinificação, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CET 11783 é usada para a produção de poligalacturonases utilizando a pele da uva como fonte de carbono (TAPRE; JAIN, 2014). A adição de poligalacturonases durante a trituração dos frutos aumenta o rendimento do suco e também acelera a liberação de antocianinas no suco. Tratamento com poligalacturonases na pré-fermentação ou na fase de fermentação elimina as partículas em suspensão. Após a fermentação, enzima é adicionada ao vinho para aumentar a sua clareza e taxa de filtração (KASHYAP et al., 2001).

#### 2.4.2 Poligalacturonases Alcalinas

As poligalacturonases alcalinas são usadas principalmente na degomagem e maceração de culturas de fibras e pré-tratamento de efluentes pécnicos de indústrias de sucos de frutas. Enzimas alcalinas são produzidas principalmente de fontes bacterianas, na grande maioria por *Bacillus* spp. (KASHYAP et al., 2001).

Essas enzimas são utilizadas na indústria de papel e celulose. Na fabricação do papel, a poligalacturonases pode despolimerizar pectinas e, posteriormente, reduzir a demanda catiônica de soluções de pectina e o filtrado do branqueamento com peróxido (REID; RICARDO, 2000). De acordo Oumer (2017), polpas preparadas com enzimas pectinolíticas produzem papel mais volumoso com maior opacidade e melhor capacidade de impressão do que polpas preparadas por um processo químico alcalino. Chauhan e Sharma (2014) observaram em seu estudo que o tratamento com pectinase resultou em papel artesanal de boa qualidade das fibras de bananeira tratadas em comparação com as respectivas fibras de controle e o tratamento foi considerado econômico.

Na indústria têxtil as poligalacturonases têm sido utilizadas em conjunto com amilases, lipases, celulasas e hemicelulasas para remover agentes de dimensionamento do algodão de forma segura e ecológica, substituindo a soda cáustica tóxica utilizada comumente. As fibras vegetais contêm goma, que deve ser removida antes de seu uso para a fabricação têxtil (HOONDAL et al., 2002). O tratamento de degomagem química é poluente, tóxico e não biodegradável. Uma alternativa é degomagem biotecnológica utilizando poligalacturonases em combinação com xilanases.

Nesse contexto, as poligalacturonases têm desempenhado um papel crucial na retificação de linho e juta, promovendo a separação das fibras e a remoção das pectinas. Além disso, são empregadas na preparação biológica do algodão e no processo de polimento enzimático de tecidos que combinam juta e algodão (HOONDAL et al., 2002).

Na indústria de alimentos, é utilizada na fermentação de chás e destrói a propriedade formadora de espuma dos pós para chás instantâneos, destruindo as pectinas. No café, as poligalacturonases são essenciais para remover a mucilagem do grão, que é composto por polissacarídeos, como pectina, celulose e amido. A mucilagem pode prolongar o tempo necessário para a secagem dos grãos e pode levar ao desenvolvimento de fungos, o que reduz a qualidade final do café. O processo de fermentação é facilitado por enzimas que ocorrem naturalmente no fruto do café e na microflora adquirida do meio ambiente, ou por culturas iniciais adicionadas ao café para melhorar também o perfil físico, químico e sensorial do café (HAILE; KANG, 2019; SIRIDEVI et al., 2019). As enzimas mais importantes produzidas por

microrganismos para degradar substâncias pectina durante a fermentação do café são pectina liase, poligalacturonase e pectina metilesterase (SOUZA; KAWAGUTI, 2021).

As enzimas são utilizadas na extração de óleo de estruturas vegetais, como cascas de frutas, polpas e sementes, com o auxílio da extração enzimática aquosa. A principal função das enzimas é degradar e quebrar a parede celular de uma estrutura vegetal para facilitar a liberação de óleo da matriz. A aplicação enzimática pode ser isolada ou combinando diferentes enzimas com efeito positivo no rendimento do óleo (MWAURAH et al., 2019).

Óleos cítricos, como o limão, podem ser extraídos com poligalacturonase (JAYANI et al., 2005). Os óleos essenciais estão localizados especialmente nas células do albedo de frutas cítricas e contêm hidrocarbonetos como terpenos e esquiterpenos, compostos oxigenados como aldeídos, ésteres, álcoois, cetonas e fenóis, e resíduos não voláteis como ceras, flavonoides e ácidos graxos (KASHYAP et al., 2001). A poligalacturonase hidrolisa os complexos pectina-proteína, eliminando as propriedades emulsificantes da pectina, o que interfere na extração, possibilitando a obtenção de óleos de casca cítrica (SOUZA; KAWAGUTI, 2021).

As preparações de poligalacturonase também são usadas na indústria do azeite para aumentar a produção de extração de óleo e melhorar os indicadores de qualidade do óleo. Preparações enzimáticas comerciais contendo poligalacturonase, celulasas e hemicelulasas passaram a ser utilizadas para a extração do azeite, sendo adicionadas durante a prensagem das azeitonas para melhorar o processo de extração (KASHYAP et al., 2001; BHARDWAJ et al., 2017; KAWAGUTI; KOBLITZ, 2019).

As poligalacturonases ainda são usadas em coquetel enzimático usado para a produção de rações animais. Uma vez que reduz a viscosidade da ração, aumenta a absorção de nutrientes, libera nutrientes, seja pela hidrólise de fibras não biodegradáveis ou pela liberação de nutrientes bloqueados por essas fibras, e reduz a quantidade de fezes (HOONDAL et al., 2000; JAYANI; SAXENA; GUPTA, 2005).

## **2.5 Extração de carotenoides**

Frutas, vegetais e algas naturalmente têm pigmentos, sendo os principais, as clorofilas (cor verde), carotenoides (cor amarelo-laranja-vermelho), antocianinas (cor vermelho-azul-roxo) e betalanina (vermelho) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019; MIRANDA et al., 2021).

Carotenoides são pigmentos naturais, amplamente presentes em vegetais e frutas, como cenoura, tomate, milho, mamão, melancia, e em alguns peixes (salmão) e crustáceos (lagosta cozida, caranguejo e camarão) (MIRANDA et al., 2021). E ainda, originam a cor amarelo-

avermelhado de diversos alimentos, pois são utilizados como aditivos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019).

Os carotenoides, incluindo licopeno, luteína,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, são uma das principais fontes de antioxidantes nos frutos de tomates. A cor vermelha dos tomates maduros é causada pelo licopeno, o carotenoide mais abundante, que representa mais de 85% dos carotenoides (CATALKAYA; KAHVECI, 2019).

Carotenoides são isoperóides lipofílicos que podem ser classificados de acordo com suas características químicas e nutricionais (MUSSAGY et al., 2019). Quimicamente, são classificados como carotenos, compostos apenas de átomos de carbono e hidrogênio e xantofilas que, além de carbono e hidrogênio, têm oxigênio em sua estrutura, como parte de um grupo funcional (COLMÁN-MARTINEZ et al., 2016; DELGADO-PELAYO et al., 2016; CATALDO et al., 2018; MIRANDA et al., 2021).

Quanto a suas propriedades nutricionais, os carotenoides são geralmente classificados como pró-vitamina A, ou seja,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina e  $\alpha$ -caroteno, ou não-provitamina A, ou seja, licopeno, luteína, zeaxantina (MALDONADE et al., 2007; TOTI et al., 2018), e cetocarotenoides, como canthaxantina e astaxantina (JAYARAJ et al., 2008).

Diante disso, além de seu amplo uso como corantes e no enriquecimento de alimentos, também são utilizados devido a sua atividade pró-vitáminica A e as propriedades que resultam em possíveis funções biológicas benéficas à saúde, tais como o fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas (ANUNCIACÃO et al., 2019). Sendo então muito utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e ração.

Ao longo das últimas décadas, houve esforços conjuntos para o desenvolvimento de métodos de extração aprimorados para carotenoides. No entanto, a recuperação de matrizes alimentares complexa ainda é um desafio, devido a barreiras físicas e químicas presentes na matriz alimentar que impedem a transferência em massa de carotenoides durante a extração, bem como a presença de diversos conjuntos de carotenoides com níveis variados de polaridade que dificulta sua extração simultânea (SAINI; KEUM, 2018).

Devido à sua natureza hidrofóbica, carotenoides são convencionalmente extraídos usando solventes orgânicos. Geralmente, solventes não polares, como hexano, éter de petróleo ou tetrahidrofurano (THF), são uma excelente escolha para a extração de carotenos não polares ou xantofilas esterificadas, enquanto solventes polares como água, acetona, etanol e acetato etílico são mais apropriados para a extração de carotenoides polares. Os diferentes métodos utilizados para a extração de carotenoides de fontes naturais podem ser classificados em categorias: extração por solventes (SE), extração assistida por micro-ondas (MAE), extração

assistida por ultrassom (EAU), extração líquida pressurizada (PLE), extração assistida em campo elétrico pulsado (PEFAE), extração de fluidos supercríticos (SFE), extração assistida por enzimas (EAE) e química verde (SAINI; KEUM, 2018; LIU et al., 2019; CAÑADAS et al., 2020).

Todas essas técnicas têm sido utilizadas para a extração de compostos presentes em matrizes alimentares. Alguns desses métodos (MAE, EAU, PLE, PFAE e SFE) têm sido intensamente exploradas para a extração de compostos bioativos, pois apresentam vantagens como maior eficiência, redução dos tempos de extração e menores custos de energia (ZIA et al., 2020). A Tabela 4 apresenta as principais vantagens e desvantagens de vários métodos de extração.

Tabela 4 - Vantagens e desvantagens de métodos de extração de carotenoides.

<b>Método de Extração</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Extração por solventes (SE)	Método simples, rápido e econômico	Maior tempo para extração e baixo rendimento
Extração assistida por micro-ondas (MAE)	Método simples, rápido e econômico	Pode causar degradação térmica e <i>isomerização cis-trans</i> de carotenoides
Extração assistida por ultrassom (EAU)	Extração rápida, não térmica e eficiente	O envelhecimento da superfície da sonda ultrassônica pode alterar a eficiência de extração O tamanho de partículas pequenas ( $\approx 50 \mu\text{m}$ ) é necessário para alcançar uma boa extração
Extração líquida pressurizada (PLE)	Rápido (poucos minutos), requer quantidade mínima de solvente orgânico Altamente aplicável a um contexto em escala de laboratório	Difícil de aplicar a grandes volumes devido ao entupimento causado por açúcares e pectinas de matrizes vegetais
Extração de campo elétrico pulsado (PEF)	Alto rendimento de extração Processo não térmico Baixo uso de energia	Altos custos de instrumentação Bolhas nas amostras podem causar problemas técnicos Parâmetros do FPE podem diferir com mudança na condutividade elétrica da amostra

Tabela 5 – Continuação.

	Utiliza solvente não inflamável, não tóxico e reciclável (CO <sub>2</sub> e etanol)	
Extração de fluido supercrítico (SFE)	Processo de extração contínua em vez de processamento em lote	Não é adequado para amostras contendo altas quantidades de água Baixo rendimento de carotenoides polares
	Útil para extração de compostos termolabílicos	Alto custo de instrumentação
	Forneça carotenoides com alta pureza	
Extração assistida por enzimas (EAE)	Extração rápida e eficiente com uso mínimo de solventes	Alto custo das enzimas

Fonte: Saini e Keum (2018); Miranda et al. (2021) modificado pela autora.

As enzimas são ferramentas altamente eficazes para catalisar uma variedade de processos químicos e biológicos (DAS, NADAR, RATHOD, 2021). Em comparação com solventes, elas consomem menos energia e apresentam menor impacto ambiental e riscos para a saúde, tornando-se uma opção mais sustentável (MACKENZIE et al., 2015).

Esse poder catalítico das enzimas é aproveitado de forma eficaz na extração, facilitando a quebra da matriz celular e permitindo a liberação de metabólitos no solvente, o que melhora a recuperação de produtos de alto valor. Ao selecionar ou projetar uma enzima, é crucial considerar sua bioatividade, seletividade em relação ao substrato e estabilidade em condições desafiadoras, como pH extremo, alta temperatura e presença de solventes (MADHAVAN et al., 2017). Além das propriedades intrínsecas da enzima, a composição celular do substrato desempenha um papel crucial, uma vez que a rigidez da célula pode tornar o processo de extração mais desafiador.

### 2.5.1 Extração de carotenoides com poligalacturonases

A extração assistida por enzimas tem chamado a atenção de pesquisadores devido à sua abordagem tecnológica eficiente, sustentável e *eco-friendly* (DAS; NADAR; RATHOD, 2021). Esta técnica oferece vantagens notáveis, incluindo alta eficiência e tempos de extração reduzidos. Seu princípio fundamental reside na quebra da parede celular da planta, permitindo a liberação de compostos valiosos presentes na camada intracelular, tais como materiais ativos e pigmentos de interesse (SHELDON et al., 2013).

A produção comercial de carotenoides a partir de microrganismos concorre principalmente com a produção sintética por procedimentos químicos. Atualmente, os

carotenoides utilizados industrialmente são obtidos por via química ou extração de plantas e/ou algas (VALDUGA et al., 2009). Entretanto, devido à preocupação com o uso de aditivos químicos em alimentos, houve um crescente interesse nos carotenoides obtidos naturalmente por processos biotecnológicos.

Além da conotação intrínseca à natureza, os produtos resultantes da produção microbiana oferecem a vantagem de serem obtidos em um curto período de tempo, independentemente da estação do ano. A produção biotecnológica de carotenoides tem se destacado devido a diversos fatores, como a capacidade de utilizar substratos de baixo custo para a bioprodução, a autenticidade como substâncias naturais, a necessidade de um espaço físico reduzido para produção, não estando sujeita às condições ambientais como clima, estação do ano ou composição do solo, e a possibilidade de controle preciso das condições de cultivo (DAS; NADAR; RATHOD, 2021).

Muitos microrganismos produzem carotenoides, porém nem todos são industrialmente interessantes. As leveduras destacam-se pelo seu uso como fonte proteica, capacidade de crescimento em substratos de baixo custo e alto teor de açúcar. Os tipos de carotenoides e a quantidade relativa destes podem variar dependendo das condições do meio de cultura, temperatura, pH, taxa de aeração e luminosidade (VALDUGA et al., 2009).

## **2.6 Frutos amazônicos**

O Brasil possui inúmeras espécies de frutas nativas e exóticas, ainda pouco exploradas. Aproximadamente metade desses frutos estão na região amazônica, tornando a Amazônia uma riquíssima reserva natural de alimentos e plantas medicinais em todo o mundo (NEVES et al., 2015; RUFINO et al., 2010). A maioria das frutas nativas da região amazônica é cultivada para consumo em mercados locais; no entanto, eles são mal explorados. Os frutos amazônicos são uma boa fonte de micronutrientes, como minerais e vitaminas, fibras, compostos fenólicos e pigmentos (RUFINO et al., 2010).

### **2.6.1 Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.)**

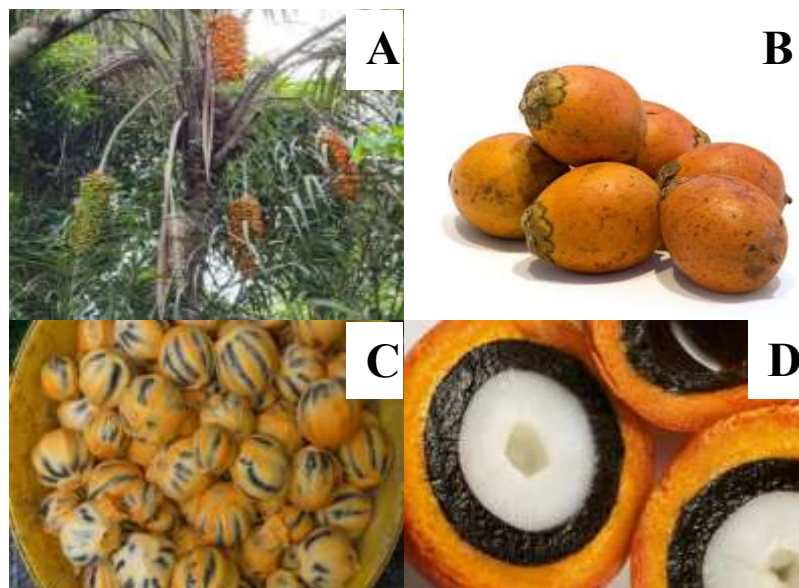
A palmeira tucumã, espécie *Astrocaryum vulgare* Mart., pertence ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, ordem Arecales, família Arecaceae, e gênero *Astrocaryum* (OLIVEIRA et al., 2018). Nativa da Amazônia que abrange territórios como Bolívia, Colômbia, Venezuela e no Brasil está presente no lado leste da Amazônia, no Norte (Amapá, Pará e Tocantins), Nordeste (estados do Maranhão e Piauí) e Centro-Oeste (estado de

Goiás) do Brasil (VIANNA, 2020). No Brasil, é popularmente conhecida por uma diversidade de nomes como tucumã-arara, tucumã piranga, tucumã-piririca, tucumã-uassu-rana, tucum-assu, tucum-bravo, tucum-da-serra, tucum-do-matto e tucum-purupuru.

A palmeira pode chegar a 20 metros de altura e 20 cm de diâmetro. Os entrenós são cobertos por espinhos pretos de até 22 cm de comprimento. As folhas são pinadas e os pecíolos medem até 2 m de comprimento, sendo cobertos por espinhos pretos planos, parcialmente até 10 cm de comprimento. Inflorescências e infrutescências são eretas. As brácteas medem até 2 m de comprimento e são densamente cobertas por espinhos pretos de até 5 cm de comprimento. Os frutos (Figura 3) são globosos, elipsoides (3,5 a 5 cm de comprimento e 2,5 a 4 cm de diâmetro). O epicarpo é liso e apresenta cores laranja ou vermelha. O mesocarpo é alaranjado, carnudo, fibroso e doce. O endocarpo é resistente e preto. O endosperma é homogêneo (VIANNA, 2020). Os frutos de tucumã laranja aparecem na estação chuvosa (maio) e durante a estação seca, entre junho e dezembro (SMITH, 2015).

Em média, cada palmeira pode produzir de 2 a 5 cachos de frutos por ano, contendo 200 a 400 frutos, e cada cacho pesa de 10 a 30 Kg. (SHANLEY et al., 2012) (Figura 8). O fruto pertence ao tipo de drupa, cuja cor da casca e da polpa variam do amarelo ao laranja escuro, existindo apenas uma semente por unidade de fruto. (SAGRILLO et al., 2015; FERREIRA et al., 2021). O fruto tem diâmetro de 5 a 6 cm e massa de 70 a 75 gramas, sendo utilizado principalmente na confecção de pratos regionais e consumido in natura (MATOS et al., 2019).

Figura 3 - Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.), palmeira (A), fruto (B), fruto despulpado (C) e fruto demonstrando epicarpo, mesocarpo e endocarpo (D)



Fonte: Da Fonseca Machado et al., (2021), adaptado.



O fruto tem sido usado na culinária como purê, sorvete e bebidas. O palmito é utilizado na culinária, e seus frutos são amplamente comercializados na região amazônica (VIANNA, 2020). Além disso, o estipe de palmeira é usado em edifícios rurais e as fibras das folhas são um ótimo material para fazer redes, cordas e sacos. Como material biodegradável, pode ser utilizado para inúmeras aplicações, como engenharia, construção civil, automotiva e indústrias balísticas (OLIVEIRA et al., 2020). Os frutos têm sido considerados como uma opção na forma de produtos nutracêuticos, farmacêuticos e cosméticos na indústria (DOS SANTOS et al., 2015).

#### 2.6.2 Bacupari (*Garcinia gardneriana*)

O bacuparizeiro (*Garcinia gardneriana* (Planch & Triana) Zappi), é árvore nativa, pertencente à família Clusiaceae e ao gênero *Garcinia* (DEMENCIANO et al., 2020), cuja espécie é nativa da Floresta Amazônica brasileira. É encontrado na margem de rios e córregos, e por isso, em determinadas épocas do ano, suporta inundações ou submersão por vários dias, tal capacidade permite que a fruta bacupari se adapte facilmente ao clima brasileiro diverso (SOUZA et al., 2013; ROCHA, 2018). A árvore bacupari floresce de agosto a setembro, produzindo frutos no mês de outubro (SANTA-CECÍLIA et al., 2011).

Figura 4 - Bacuparizeiro com frutos (A); Bacupari (*Garcinia gardneriana*) fruto maduro (B)



Fonte: Giacon (2019).

A árvore, normalmente tem entre 5 e 10 metros de altura, podendo alcançar 15 m de altura, e entre 10 e 15 cm de diâmetro, com ramos em ângulo obtuso, ramos cilíndricos, sulcados, ramos jovens ligeiramente ásperos, finamente papilhosos, látex amarelo. As folhas são opostas, com pecíolo alongado, lâmina opaca em ambas as faces, nervura central bem

marcada, cada folha tem entre 5 e 23,5 cm de comprimento, 2 e 11,5 cm de largura (ZAPPI et al., 2015; FILARDI et al., 2018; BRAZIL FLORA GROUP, 2022).

Os botões florais são globosos, pedicelos com 1 a 2,5 cm de comprimento, 2 a 3 sépalas branco-esverdeadas, côncavas, delicadas, membranáceas, com 2 mm de altura e 1,5 mm de largura; 4 a 5 pétalas alvas, estriadas, com 3,5 mm de altura e 2,5 mm de largura, reflexas após a antese. Possuem flores masculinas, que são pouco numerosas (10-15) e flores hermafroditas (3-5) (BITTRICH et al., 2015; MUNIZ, 2020; ZAPPI et al., 2015; FILARDI et al., 2018; BRAZIL FLORA GROUP, 2022).

A fruta, é conhecida popularmente como bacupari, bacoparé, bacopari, mangostão amarelo e ainda de bacupari miúdo (ARWA et al., 2015). Inicialmente verde escura, tornando-se verde amarelado e laranja quando amadurece. A casca da fruta é lisa e coriácea, elipsóide, com 2 a 2,5 cm de comprimento, com ápice arredondado ou pouco pronunciado, coroado por estigma remanescente, base mais estreita, assentado sobre restos do disco, estames e pétalas, apresenta de 2 a 4 sementes por fruto (BITTRICH et al., 2015; ZAPPI et al., 2015; FILARDI et al., 2018; MUNIZ, 2020; BRAZIL FLORA GROUP, 2022). A polpa é branca, comestível com sabor doce, sendo derivada principalmente do endocarpo (ASINELLI, 2011), é consumida tanto *in natura* (ROCHA et al., 2018) e corresponde, em média, a 37% a 40% do peso da fruta (DE MELO et al., 2022).

A casca e sementes do bacupari compõem cerca de 60% da massa da fruta (DE MELO et al., 2022). Na literatura é possível verificar que o bacupari é rico em propriedades fitoterápicas com potencial de uso na indústria alimentícia, com papel antioxidante graças às suas propriedades bioativas (DE MELO et al., 2021). Já foi comprovado que os compostos bioativos presentes nos extratos de casca e sementes de bacupari possuem propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, ansiolíticas, leishmanicidas, fotoprotetores e antioxidantes (MELO et al., 2021; FIGUEIREDO et al., 2014; CARVALHO-SILVA et al., 2012; GONTIJO et al., 2012; MARTINS, 2008).

Alguns estudos fotoquímicos descreveram a presença de metabolitos secundários bioativos para o gênero *Garcinia*, dentre eles: xantonas, esteróides, triterpenos e flavonóides (DELLEMONACHE et al., 1983; BRAZ FILHO et al., 1970), os quais estão associados a efeitos farmacológicos, tais como antiinflamatórios, antinociceptivos, antibacterianos e antiparasitário (SUBEKI et al., 2004; VERDI et al., 2004; CASTARDO et al., 2008; OTUKI et al., 2011; MELO et al., 2014).

De Melo et al. (2022) desenvolveram farinhas a partir dos subprodutos (a casca e a semente) do bacupari em duas etapas de maturação e posteriormente avaliaram sua composição

próxima, física, antioxidante, bioativa, microestrutural e térmica. Os resultados revelaram que as farinhas têm alto teor de fibras e são uma fonte potencial de proteína. Os autores relatam que a farinha de sementes tem um valor energético semelhante ao da farinha de trigo e outras farinhas convencionais. As farinhas contêm compostos fenólicos e apresentam atividade antioxidante, especialmente a farinha de casca não madura e ambas podem ser utilizadas como ingredientes alternativos em diversos setores da indústria alimentícia.

Outro estudo dos autores De Melo et al. (2022) desenvolveram o pó de polpa bacupari (BPP) em duas etapas de maturação e avaliaram suas propriedades físico-químicas, microestruturais e bioativas. Os dados mostraram que o BPP pode ser considerado como uma fonte de fibra, a polpa imatura pode ser considerada como uma fonte de proteína. Os autores revelam que foram os primeiros a quantificar e identificar compostos bioativos e atividade antioxidante na polpa da fruta.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

O presente estudo teve como objetivo produzir poligalacturonase a partir de linhagens bacterianas isoladas de frutos amazônicos, caracteriza-las bioquimicamente e avaliar o seu potencial de aplicação na extração de carotenoides dos frutos amazônicos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Produzir poligalacturonase a partir de culturas bacterianas, isoladas de frutos da Amazônia (Tucumã e Bacupari), puras e mistas;
- Caracterizar bioquimicamente a poligalacturonase produzida em termos de temperatura e pH reacional
- Avaliar a estabilidade térmica e frente ao pH da poligalacturonase produzida;
- Avaliar o efeito dos íons metálicos sobre a atividade de poligalacturonase produzida;
- Avaliar o potencial de aplicação da poligalacturonase produzida na extração de carotenoides.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Aplicada – LAMA e no Laboratório de Bioprocessos e Catálise/Laboratório de Instrumentação Científica - LABIC da Universidade Federal do Tocantins – UFT, *Campus* Palmas, TO. O projeto é vinculado ao PROCAD Amazônia Legal (Convênio: 1707/2018) e PDPG-FAP (18/2020).

### 4.1 Microrganismos: manutenção e inóculo

As linhagens bacterianas (Tabela 6) estudadas neste projeto foram isoladas de frutos de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart) e bacupari (*Rheedia gardneriana*) por (SANTOS, 2022), foi realizando a triagem de microrganismos e as identificadas como produtoras de poligalacturonases por meio da fermentação espontânea dos frutos. As linhagens foram mantidas no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade Federal do Tocantins, *Campus* de Palmas, TO. As linhagens foram preservadas em tubos de centrífuga (2 mL), contendo 50% de glicerol a 40%, e 50% do meio de cultura contendo 10 g/L de tripton, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de cloreto de sódio. As linhagens foram mantidas em ultrafreezer a -80 °C até o momento da reativação.

Tabela 6 - Linhagens bacterianas utilizadas para a triagem de produção de poligalacturonases.

<b>Linhagens</b>	<b>Gênero</b>
BCLB-785	<i>Klebsiella oxytoca</i>
TCLB-25	<i>Cronobacter sakazakii</i>
TCMK-112	<i>Kosakonia sp.</i>
BCLB-179	<i>Klebsiella aerogenes</i>
BCLB-122	<i>Proteus sp.</i>
BCLB-197A	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
TCMK-109	<i>Kosakonia sp.</i>
BCLB-640	<i>Bacillus siamensis</i>
BCLB-197B	<i>Klebsiella aerogenes</i>

Fonte: Próprio Autor, 2024.

A reativação foi realizada retirando a amostra dos tubos de centrífuga com o auxílio de uma alça descartável estéril, inoculando-a em placa de Petri contendo 5 g/L de peptona de soja,

3 g/L de extrato de carne e 20g/L de ágar bacteriológico. Os isolados permaneceram incubados a 30 °C por 24 horas.

#### 4.2 Cultivos dos microrganismos

O pré-inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 20 mL do meio basal composto por 5 g/L de peptona de soja e 3 g/L de extrato de carne. O meio de cultivo foi esterilizado a 121 °C por 15 minutos em autoclave. Posteriormente foi inoculado um isolado das diferentes amostras nos frascos Erlenmeyer (125 mL). O cultivo de pré-inóculo foi mantido a 150 rpm, em 30 °C por 24 horas no Agitador Orbital com controle de temperatura.

#### 4.3 Produção de poligalacturonases em cultivo submerso

Na Tabela 7 são apresentadas as linhagens utilizadas para produção de poligalacturonases com culturas puras e mistas.

Tabela 7 - Linhagens bacterianas utilizadas na produção de poligalacturonases em culturas puras e culturas mistas.

<b>Cultura pura</b>	<b>Cultura mista</b>
BCLB-640	BCLB-197B + BCLB197A
BCLB-197A	BCLB-197B + TCMK-109
BCLB-197B	BCLB-197B+ BCLB-640
TCMK-109	BCLB-197A + TCMK-109
	BCLB-197A + BCLB-640
	TCMK-109 + BCLB-640

Fonte: Próprio Autor, 2024.

O método utilizado para a produção de poligalacturonases foi adaptado de Reddy et al. (2010). Onde o cultivo submerso ocorreu em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo meio mineral (MM) adicionado de 1% de pectina cítrica (m/v), 3,0 g/L de sulfato de amônio, 1,5 g/L de fosfato monopotássico, 0,2 g/L de sulfato de magnésio, 3,5 g/L de fosfato dissódico, 1 g/L de extrato de levedura, o pH final foi ajustado para 7,0 utilizando hidróxido de sódio (NaOH)

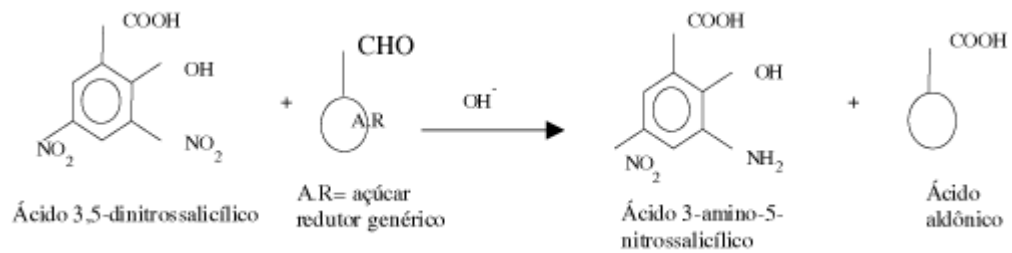
1M (SOARES et al., 1999). O meio foi esterilizado a uma temperatura de 121°C durante 15 minutos em autoclave.

Os cultivos submersos foram realizados utilizando-se 1 mL do pré-inóculo para as culturas puras e 1 mL de cada uma das culturas mistas, para inocular 18 mL de meio de cultivo, para a produção da enzima. Os cultivos submersos foram realizados em incubadora refrigerada com agitação orbital a 150 rpm, 30 °C por 48 horas. Após o tempo de cultivo, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 30 minutos a 10 °C para obtenção do sobrenadante (extrato enzimático bruto) e posteriormente determinação da atividade de poligalacturonase. Com a determinação da atividade de poligalacturonases para as culturas puras e mista foi possível selecionar as que obtiverem melhores resultados em suas atividades.

#### **4.4 Determinação da atividade de poligalacturonase**

A atividade enzimática de poligalacturonase foi realizada adicionando 800 µL de uma solução de pectina cítrica a 1 % (m/v) em tampão McIlvaine pH 5,0 em tubos de ensaio. Os tubos foram mantidos a 50 °C por 5 minutos. O início da reação ocorreu com a adição de 200 µL do extrato enzimático e, em diferentes intervalos de tempo (entre 0 e 5 minutos), retirou-se 200 µL da reação, adicionando-os em tubos contendo 200 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). O branco da reação foi realizado nas mesmas condições experimentais com a adição de água destilada em substituição do extrato enzimático. Então, os tubos foram levados para fervura em banho maria a 100 °C onde permaneceram por 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em banho de gelo e, em seguida, 2 mL de água destilada foram adicionados em cada tubo para posterior leitura. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS a 540 nm. Esta análise, utilizando o DNS, identifica a presença do grupo carbonila livre (C = O), chamados de açúcares redutores (MILLER, 1959). Segundo Deshavath et al. (2020) e Silva et al. (2003) esse ensaio envolve a oxidação do grupo funcional aldeído presente no ácido correspondente, enquanto o DNS é simultaneamente reduzido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico em condições alcalinas (Figura 5). Uma unidade de atividade pectinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de ácido galacturônico, por mililitro, por minuto.

Figura 5. Redução do ácido dinitrossalicílico pelo açúcar redutor, formando o ácido 3-amino-5-nitrossalicílico, dando origem ao ácido aldônico



Fonte: Silva et al., (2003).

O cálculo para determinação da atividade está exposto na equação 1.

$$\text{Atividade enzimática} = \left( \frac{A_F - A_I}{\varepsilon} \right) \times \frac{1}{V_I} \times 10^3 \times V_F \times \frac{1}{t} \times \text{diluição}$$

(1)

Onde:

$A_F$ : Absorbância final

$A_I$ : Absorbância inicial

$\varepsilon$ : Coeficiente de extinção molar ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

$V_I$ : Volume inicial

$V_F$ : Volume final

$t$ : tempo (min)

## 4.5 Caracterização bioquímica da poligalacturonase

### 4.5.1 Efeito da temperatura do meio reacional sobre atividade enzimática

Para a otimização de temperatura do meio reacional foi realizada a avaliação em uma faixa compreendida entre 20 e 80 °C, com intervalos de 5 °C, em pH 5,0. A determinação da atividade se realizou conforme descrito nos itens 4.4.

Para determinar a média entre as atividades enzimática foi aplicado o cálculo que determina a atividade relativa. A atividade relativa é a maior atividade enzimática obtida, que

mostra a frequência que a menor atividade obtida tem em relação a maior atividade, portanto, é representada como porcentagem.

O cálculo para determinação da atividade relativa está exposto na equação 2.

$$\text{Atividade relativa} = \frac{ATV1}{ATV2} \times 100\% \quad (2)$$

Onde:

ATV1: maior Atividade

ATV2: menor Atividade

#### **4.5.2 Efeito das concentrações de pH do meio reacional sobre a atividade enzimática**

Para avaliar o efeito do pH sobre a atividade enzimática da poligalacturonase, o pH do extrato enzimático bruto foi ajustado para 3,0 a 8,0 com intervalos de 0,5 ( $3,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$ , com  $\Delta = 0,5$ ) com diferentes tampões McIlvaine (3,0-8,0), sendo que a determinação da atividade foi realizada conforme descrito nos itens 4.4. Para determinar a atividade relativa foi aplicado o cálculo conforme descrito nos itens 4.5.1.

#### **4.5.3 Estabilidade térmica de poligalacturonase**

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada pela incubação do extrato enzimático bruto, em banho-maria, a diferentes temperaturas (40 °C, 50 °C e 60 °C). Alíquotas de 1 mL do extrato enzimático bruto foram retiradas em intervalos de tempo pré-definidos (0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200, 240 minutos) e transferidas para banho de gelo para a inativação da enzima e então foram utilizadas para a determinação da atividade enzimática conforme descrito no item 4.4. Os resultados foram expressos em termos de atividade residual. Para determinar a atividade relativa foi aplicado o cálculo conforme descrito nos itens 4.5.1

#### **4.5.4 Estabilidade em pH**

A estabilidade frente ao pH foi determinada com o ajuste do pH do extrato enzimático bruto ( $3,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$ , com  $\Delta = 0,5$ ). Entretanto, utilizado 2 mL de tampão McIlvaine, com a ausência de pectina e 1 mL de enzima. A atividade enzimática como descrita no item 4.4 foi



determinada de imediato obtendo o tempo 0. Após isto, as amostras foram refrigeradas a -10 °C por 24 horas para conserva-las e posteriormente a atividade enzimática foi determinada novamente. A estabilidade frente ao pH foi expressa em termos de atividade residual da atividade enzimática. Para determinar a atividade relativa foi aplicado o cálculo conforme descrito nos itens 4.5.1

#### **4.5.5 Efeito dos íons metálicos na atividade da poligalacturonase**

O efeito de vários íons metálicos na atividade da enzima foi determinado na presença de 5 mM para cálcio, magnésio, manganês, sódio, cobre, zinco e ferro, na mistura de reação.

Neste ensaio, 200 µL da enzima foi determinado para 10 µL de íons metálicos 5 mM a 50 °C e pH 5,0 em meio reacional. No entanto, foi adicionado 790 µL do meio reacional composto por pectina cítrica a 1% como substrato em tampão McIlvane pH 5,0 e 10 µL da solução de sais. Posteriormente, a atividade da enzima foi determinada usando um espectrofotômetro a 540 nm conforme descrito no item 4.4. É importante ressaltar que para a amostra controle foi substituído os 10 µL dos sais por 10 µL de água destilada.

#### **4.6 Tratamento enzimático para a extração de carotenoides**

O extrato enzimático produzido foi avaliado quanto ao potencial para a extração de pigmentos carotenoides em tomate. Para o tratamento enzimático foram realizados testes com os 2 microrganismos positivos para poligalacturonase. Os tomates foram comprados em comércio local, lavados com água e após isso macerado manualmente com auxílio de almofariz e pistilo. O tratamento enzimático foi realizado de seguindo a metodologia de Macedo et al. (2015), com adaptações. Foram pesados 25 g de tomate e adicionou-se um volume de 50 mL de preparação enzimática, que continha 10 U de extrato enzimático liofilizado reconstituído em água destilada com 0.05% de azida sódica. As amostras foram colocadas em Erlenmeyers de 125 mL envolvidos com papel alumínio e incubadas em shaker a 30 °C a 150 rpm por 24 horas. Após isso, a mistura foi filtrada em béquer envolto de papel alumínio, filtrado com papel filtro.

##### **4.6.1 Análise de Carotenoides**

A concentração de carotenoides totais foi determinada pelo método espectrofotométrico seguindo metodologia de Higby (1962). Foram retiradas 10 mL de cada uma das amostras, a extração foi realizada com solução álcool isopropílico: hexano (3:1). O conteúdo foi transferido para um funil separador de 125 mL envolto de papel alumínio, agitou-se o funil e após a agitação foram realizadas lavagens com água destilada. Após a lavagem retirou-se a fase de cor amarela. O conteúdo foi filtrado com algodão pulverizado com sulfato de anidro P.A. em um balão volumétrico de 50 mL envolto em papel alumínio, lavou-se o algodão com hexano para a retirada de todo o pigmento do algodão, adicionou-se 5 mL de acetona e aferiu-se o balão volumétrico com hexano.

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 450 nm. Um controle foi preparado com uma mistura de álcool isopropílico e hexano. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação à amostra controle.

#### 4.7 Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos nos experimentos foram analisados pelo teste de média e submetidas a análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tuckey ao nível de 5% de significância. Foi utilizado o software SISVAR para as análises estatísticas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSÃO

### 5.1 Produção de poligalacturonase

As linhagens selecionadas com potencial para a produção de poligalacturonase foram cultivadas em condições submersas e os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Produção de poligalacturonases bacterianas em condições submersas.

<b>Linhagens</b>	<b>Atividade de Poligalacturonase (U/mL)</b>
BCLB-785	3,29±1,27 <sup>a</sup>
TCLB-25	3,57±2,63 <sup>a</sup>
TCMK-112	3,66±1,76 <sup>a</sup>

Tabela 9 - Continuação.

BCLB-179	3,77±0,70 <sup>a</sup>
BCLB-122	3,95±1,47 <sup>a</sup>
BCLB-197A	4,13±2,89 <sup>a</sup>
TCMK-109	4,23±1,76 <sup>a</sup>
BCLB-640	4,24±0,44 <sup>a</sup>
BCLB-197B	5,36±2,31 <sup>a</sup>

\*Letras iguais, na linha, não apresentam diferença significativa entre si (Tukey  $p < 0,05$ ).

Fonte: Próprio Autor, 2024.

O teste de Tukey mostrou que não houve diferença significativa entre as médias, portanto, as linhagens produtoras de poligalacturonase, BCLB-197B, BCLB-640, TCMK-109 e BCLB-197A apresentaram os maiores valores de atividade enzimática (5,36 U/mL, 4,24 U/mL, 4,23 U/mL e 4,13 U/mL, respectivamente). As linhagens que apresentaram capacidades para produção de poligalacturonases são provenientes do fruto do tucumã e do bacupari.

A literatura menciona, que o gênero *Bacillus* apresenta potencial para a produção de poligalacturonases devido sua aplicabilidade de crescimento rápido e alta capacidade de conversão do substrato em produto, o que pode acarretar na redução de custos (KAVUTHODI; SEBASTIAN, 2018). Jayani et al. (2010) relataram que a linhagem de *Bacillus sphaericus* apresentou atividade máxima da poligalacturonase (6,2 U/mL). Em outro estudo, a produção de poligalacturonase a partir da casca de laranja por *Bacillus subtilis* foi de 12,7 U/mL (KUMAR; SUNEETHA, 2016). Bibi et al. (2016) relataram uma atividade de poligalacturonase de 219,0 U/mL com 2,5% da casca de laranja produzida por *Bacillus licheniformis*. Uzuner et al. (2015) demonstraram em seus estudos uma atividade de poligalacturonase de 5,60 U/mL produzida por *B. subtilis* a partir da casca de avelã.

## 5.2 Produção de poligalacturonases bacterianas em culturas mistas

A maioria dos estudos são focados em monoculturas para a produção de poligalacturonases. Por outro lado, culturas mistas são vantajosas devido ao alto rendimento de produção e maior estabilidade dos produtos (KUVVET et al., 2019). A produção de poligalacturonase em culturas puras e mistas foram desenvolvidas utilizando as linhagens que apresentaram maior atividade enzimática. Os resultados para a produção de enzima e da

regressão são apresentados na Tabela 10. A partir da análise estatística, observou-se que atividade de poligalacturonase das linhagens BCLB-640, BCLB-197A e a cultura mista BCLB-197A + BCLB-640, tiveram e feito significativo sobre a atividade da pectinase, com nível de confiança acima de 95% ( $p < 0,05$ ).

A interação entre as linhagens TCMK-109 + BCLB-640 não houve aumento da produção. Entre as linhagens BCLB-197B + TCMK-109, BCLB-197B + BCLB-197A, BCLB-197B + BCLB-640 e BCLB-197A + TCMK-109 houve redução da produção da enzima. Em contrapartida, a mistura entre as linhagens BCLB-197A + BCLB-640, de acordo com o teste de Tukey apresentaram um aumento da atividade de poligalacturonase (Tabela 10), havendo diferença significativa nas atividades enzimáticas.

Os cultivos de BCLB-640 (*Bacillus siamensis*) e BCLB-197A (*B. amyloliquefaciens*) em culturas puras mostraram serem iguais entre si (5,52 U/mL e 5,13 U/mL, respectivamente). No entanto, a cultura mista destas linhagens (BCLB-197A + BCLB-640) foi benéfica, aumentando a atividade de poligalacturonase (11,96±4,28 U/mL). A produção de poligalacturonase pela cultura mista foi 2,85 vezes maior quando comparada às culturas puras (Tabela 10). Os microrganismos são os principais produtores de enzimas, podem interagir de forma coordenada, apresentando fenótipos com produção de enzima através de linhagens fortemente produtoras de poligalacturonase.

Tabela 10 - Produção de poligalacturonases bacterianas com culturas puras e mistas realizados em cultivos submersos.

	<b>Tratamentos</b>	<b>Atividade de Poligalacturonase (U/mL)</b>
Culturas Puras	BCLB-197A	5.13±0,46 <sup>a</sup>
	BCLB-640	5.52±0,32 <sup>a</sup>
	TCMK-109	7.45±0,17 <sup>b</sup>
	BCLB-197B	9.22±0,55 <sup>c</sup>
Culturas Mistas	BCLB-197B + TCMK-109	0.65±0,05 <sup>d</sup>
	BCLB-197B + BCLB-197A	0.96±0,05 <sup>d</sup>
	BCLB-197B + BCLB-640	1.60±0,03 <sup>d</sup>
	BCLB-197A + TCMK-109	3.34±0,42 <sup>e</sup>
	TCMK-109 + BCLB-640	8.54±0,28 <sup>b c</sup>
	BCLB-197A + BCLB-640	14.68±1,64 <sup>f</sup>

\*Letras diferentes em uma mesma coluna são significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.;

Fonte: Próprio Autor, 2024.

Fundamentalmente, a interação dos mecanismos diferenciais entre as linhagens com diferentes aumentos em sua atividade de poligalacturonase é útil no desenvolvimento de abordagens adequadas para elevar a produção de poligalacturonases bacterianas. Kuvvet et al. (2019) determinaram uma maior atividade de poligalacturonase com  $11,48 \pm 0,51$  U/mL para a mistura entre *B. subtilis* e *Bacillus pumilus* em meio de bagaço de maçã com uma proporção de 2,13, observando que a produção de poligalacturonase aumenta relativamente quando a proporção entre a mistura é aumentada.

A mistura de cultura para formar coquetéis de enzimas é vantajosa para hidrolisar a interação de vários polímeros de carboidratos, como celulose e hemicelulose. Entretanto, Bhardawal et al. (2021) evidenciaram que uma mistura de enzimas poligalacturonase e celulases melhorou a extração e clarificação para a indústria de sucos, com uma notável atividade enzimática com variações de estabilidade e parâmetros bioquímicos como pH e temperatura. Além do mais, sua produção tem sido considerada importante para o uso econômico e renovável para a geração de produtos com valor agregado.

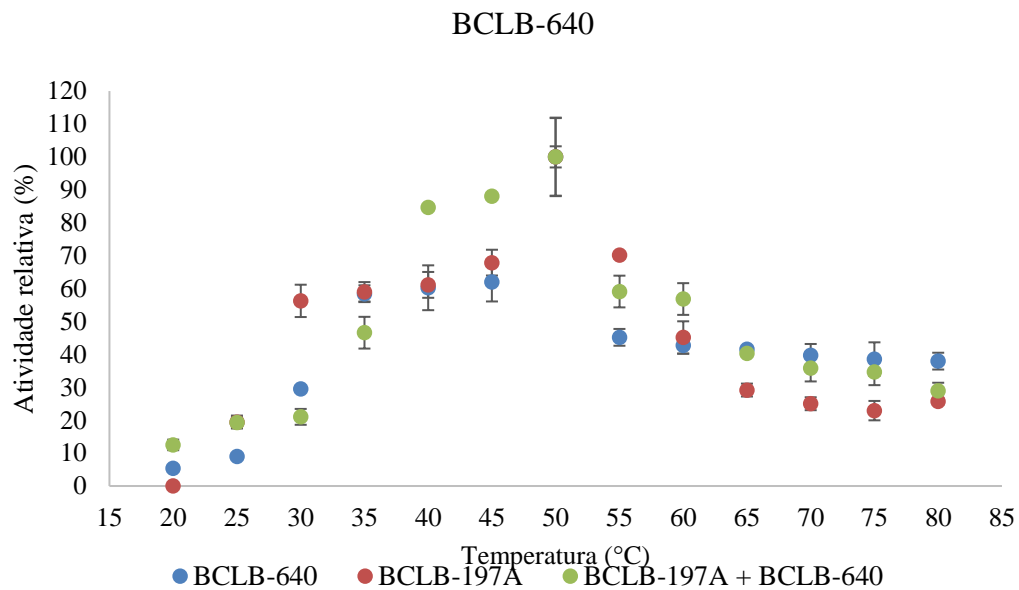
As próximas etapas no presente estudos foram realizadas apenas com as linhagens de *B. siamensis* - BCLB-640, *B. amyloliquefaciens* - BCLB-197A e BCLB-197A + BCLB-640, proveniente do fruto do bacupari, cujo apresentam ser maiores produtoras de poligalacturonase. Descartando as linhagens do fruto do tucumã por não apresentarem alta atividade enzimática.

### **5.3 Caracterização bioquímica da poligalacturonase de culturas puras e mistas**

#### **5.3.1 Efeito da temperatura do meio reacional sobre atividade enzimática**

Na Figura 6 são apresentados os resultados para o efeito da temperatura sobre a atividade de poligalacturonase das linhagens de *B. siamensis* BCLB-640, *B. amyloliquefaciens* BCLB-197A e culturas mista BCLB-197A + BCLB-640. Para a avaliação da influência da temperatura sobre a atividade de poligalacturonase, a temperatura estudada variou de 20 a 80 °C.

Figura 6. Temperatura do meio reacional sobre as atividades de poligalacturonase das linhagens de *B. siamensis* BCLB-640, *B. amyloliquefaciens* BCLB-197A e BCLB-197A +



Fonte: Próprio Autor, 2024.

As maiores atividades de poligalacturonases foram encontradas na temperatura de 50 °C para a linhagem BCLB-640 foi 5,66 U/mL, e para a linhagem BCLB-197A foi 4,91 U/mL e para a cultura mista BCLB-197A + BCLB-640 foi de 6,00 U/mL, respectivamente. Observou-se um aumento progressivo para a linhagem BCLB-640 com o aumento da temperatura de 35 °C até 50 °C, entretanto de 55 °C a 80 °C a atividade enzimática caiu 37,94% (2,15 U/mL). Isto se repetiu entre as demais amostras, onde para a linhagem BCLB-197A, houve um aumento da atividade de poligalacturonase entre as temperaturas de 30 °C até 55 °C, porém de 60 °C a 80 °C a atividade enzimática declinou 25,69% (1,26 U/mL). No entanto, para a mistura entre as linhagens foram visto um aumento gradativo da atividade de poligalacturonase na temperatura de 40 °C até 60 °C, contudo de 65 °C a 80 °C a atividade enzimática decresceu 28,96% (1,74 U/mL). Esses resultados também foram observados por Prajapati, Dudhagara e Patel (2021) em que determinaram a faixa de temperatura para a atividade de poligalacturonase obtida de *B. subtilis* entre 30 °C a 60 °C.

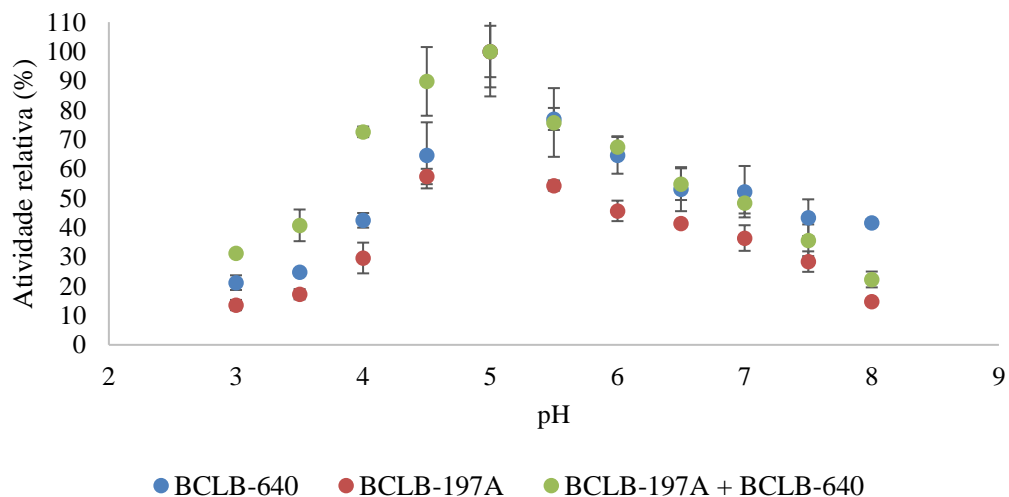
Zhang et al. (2019) determinaram a produção de poligalacturonase alcalina para *Bacillus tequilensis* a temperatura ótima de 40 °C. Guimarães et al. (2022) avaliou as propriedades bioquímicas da enzima e investigou sua aplicação na clarificação de sucos de frutos através da poligalacturonase de *Aspergillus japonicus*, produzidas a partir da casca do maracujá, apresentando uma temperatura ótima a 50 °C (93%).

### 5.3.2 Determinação do pH ótimo para a atividade de poligalacturonase

Na Figura 7 são apresentados os resultados para a atividade enzimática de poligalacturonase para diferentes valores de pH do meio reacional.

A poligalacturonase de *B. siamensis* e *B. amyloliquefaciens* apresentou maior atividade enzimática no pH 5,0 para as linhagens analisadas. A maior atividade, correspondente a 100%, para a linhagem BCLB-640 foi de 3,36 U/mL, para a linhagem BCLB-197A foi de 4,82 U/mL, e para a cultura mista entre as duas linhagens BCLB-197A + BCLB-640 foi de 4,67 U/mL, mantendo uma variação crescente de atividade de poligalacturonase para ambas as linhagens entre os pH 4,5 e 5,5. Com base no pH ótimo de atividade enzimática, a poligalacturonase pode ser largamente agrupada em alcalina ou ácida (YU; XU, 2018). O pH também consegue configurar a função da enzima, controlando a velocidade e regulando a reação. As enzimas agem melhor em um determinado intervalo de pH, e, assim como a temperatura, valores supremos de pH (ácidos ou básicos) podem causar desnaturação enzimática (MAHTO et al., 2020).

Figura 7. Efeito do pH do meio reacional sobre a atividade de poligalacturonase das linhagens de *B. siamensis* BCLB-640, *B. amyloliquefaciens* BCLB-197A e BCLB-197A + BCLB-640



Fonte: Próprio Autor, 2024.

Nas condições analisadas, observou-se que as enzimas mostraram aumento acentuado na atividade a partir do pH 3,0 e acima do pH 5,5 houve uma diminuição da atividade. Jalil e Ibrahim (2021), determinaram o pH do meio reacional para a atividade de poligalacturonase (pH 1,5-8,5) em um isolado de *Aspergillus niger*, encontrando valor ótimo para a atividade em

pH 3,5. Diferente de Mahto et al. (2022), que apresentaram a atividade de poligalacturonase em uma linhagem de *B. subtilis*, a uma ampla faixa de pH ácido de 3-7, obtendo condições ótimas em pH 4-5, respectivamente. No entanto, *B. subtilis* apresentou ótima atividade de poligalacturonase em pH 5,0, ficando em uma faixa favorável com o presente estudo (PRAJAPATI; DUDHAGARA; PATEL, 2021).

### 5.3.3 Estabilidade térmica de poligalacturonase

Na Figura 8 são apresentados os resultados para a estabilidade térmica de poligalacturonase de *B. siamensis* BCLB-640, *B. amyloliquefaciens* BCLB-197A e da cultura mista BCLB-197A + BCLB-640 em temperaturas que variaram entre 40 °C, 50 °C e 60 °C. A poligalacturonase produzida a partir da linhagem BCLB-640 (Figura 8A) manteve 59,05% da sua atividade em 40 °C até os 20 min, apresentando tempo de meia-vida após 30 min (44,29%), reduzindo após os 160 min (29,52%). Na temperatura de 50 °C a poligalacturonase reteve 68,10% da sua atividade até os 15 min, o tempo de meia-vida foi observado aos 20 min (57,13%), decaindo a partir dos 100 min (37,34%). Para a temperatura de 60 °C a poligalacturonase reteve 61,89% até atingir 15 min, o tempo de meia-vida foi notado aos 20 min (50,47%), diminuindo a partir dos 60 min (39,03%).

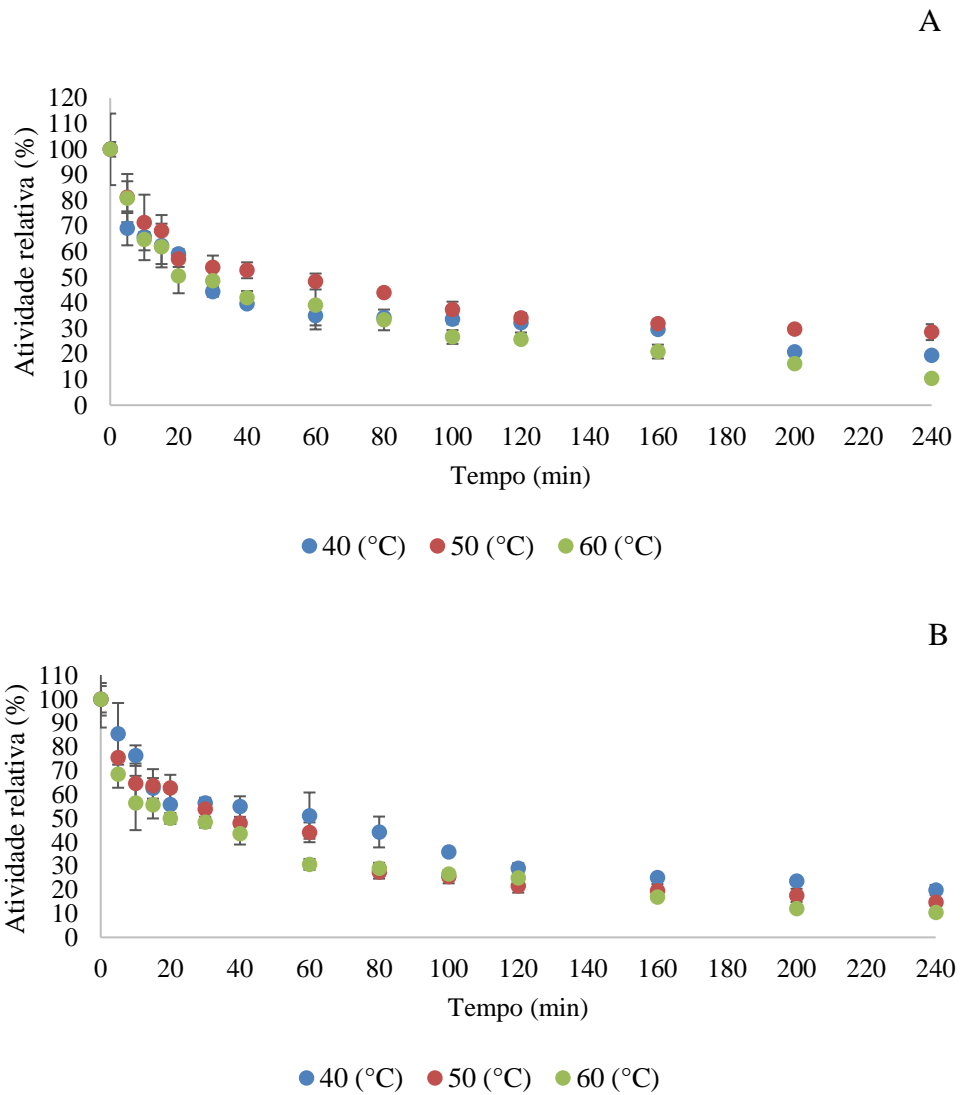
No entanto, a poligalacturonase obtida pela linhagem BCLB-197A (Figura 8B) manteve 55,71% da sua atividade em 40 °C até os 20 min, apresentando tempo de meia-vida após 30 min (56,47%), reduzindo após os 120 min (29,00%). Na temperatura de 50 °C a poligalacturonase reteve 64,70% da sua atividade até os 10 min, se mantendo estável até os 20 min (62,73%), o tempo de meia-vida foi observado a partir dos 30 min (53,90%), caindo a partir dos 80 min (27,44%). Ainda assim, para a temperatura de 60 °C a poligalacturonase teve 55,65% até atingir 15 min, o tempo de meia-vida foi observado aos 20 min (49,98%), diminuindo aos 60 min (30,65%).

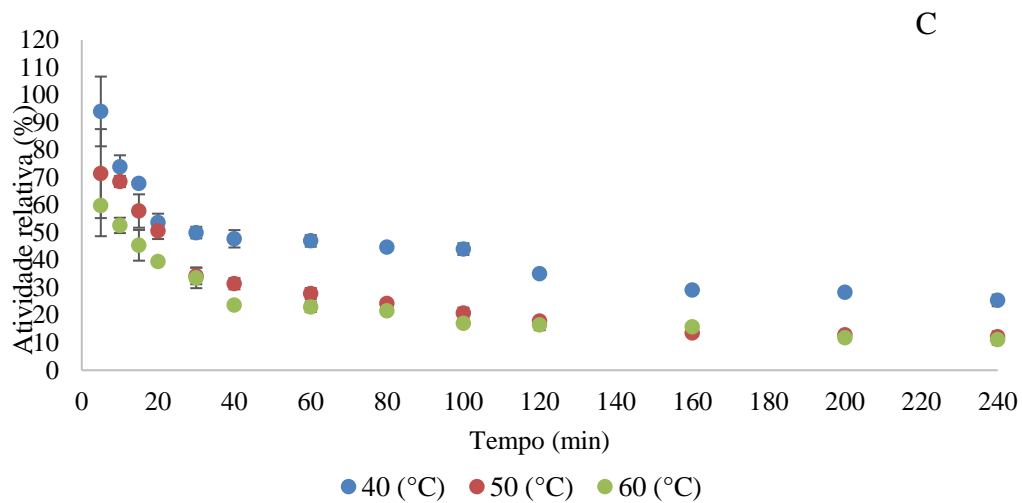
Além disso, a poligalacturonase obtida a partir dada cultura mista BCLB-197A + BCLB-640 (Figura 8C) reteve 53,72% da sua atividade em temperatura de 40 °C até os 20 min, apresentando tempo de meia-vida após 30 min (50,00%), decaindo aos 120 min (35,05%). Na temperatura de 50 °C a poligalacturonase reteve 68,57% da sua atividade após 10 min, sendo que o tempo de meia-vida foi observada a partir dos 15 min (57,85%), caindo logo em seguida aos 30 min (34,27%). Na temperatura de 60 °C a poligalacturonase reteve 59,86% da sua atividade após 5 min e 10 min (52,62%), respectivamente. O tempo de meia-vida da enzima foi



observada após os 15 min (45,39%), permanecendo até os 100 min (17,09%), quando a poligalacturonase foi totalmente desnaturada.

Figura 8. Estabilidade térmica da poligalacturonase produzida a partir das linhagens de *B. siamensis* BCLB-640 (A), *B. amyloliquefaciens* BCLB-197A (B) e BCLB-197A + BCLB-640 (C)





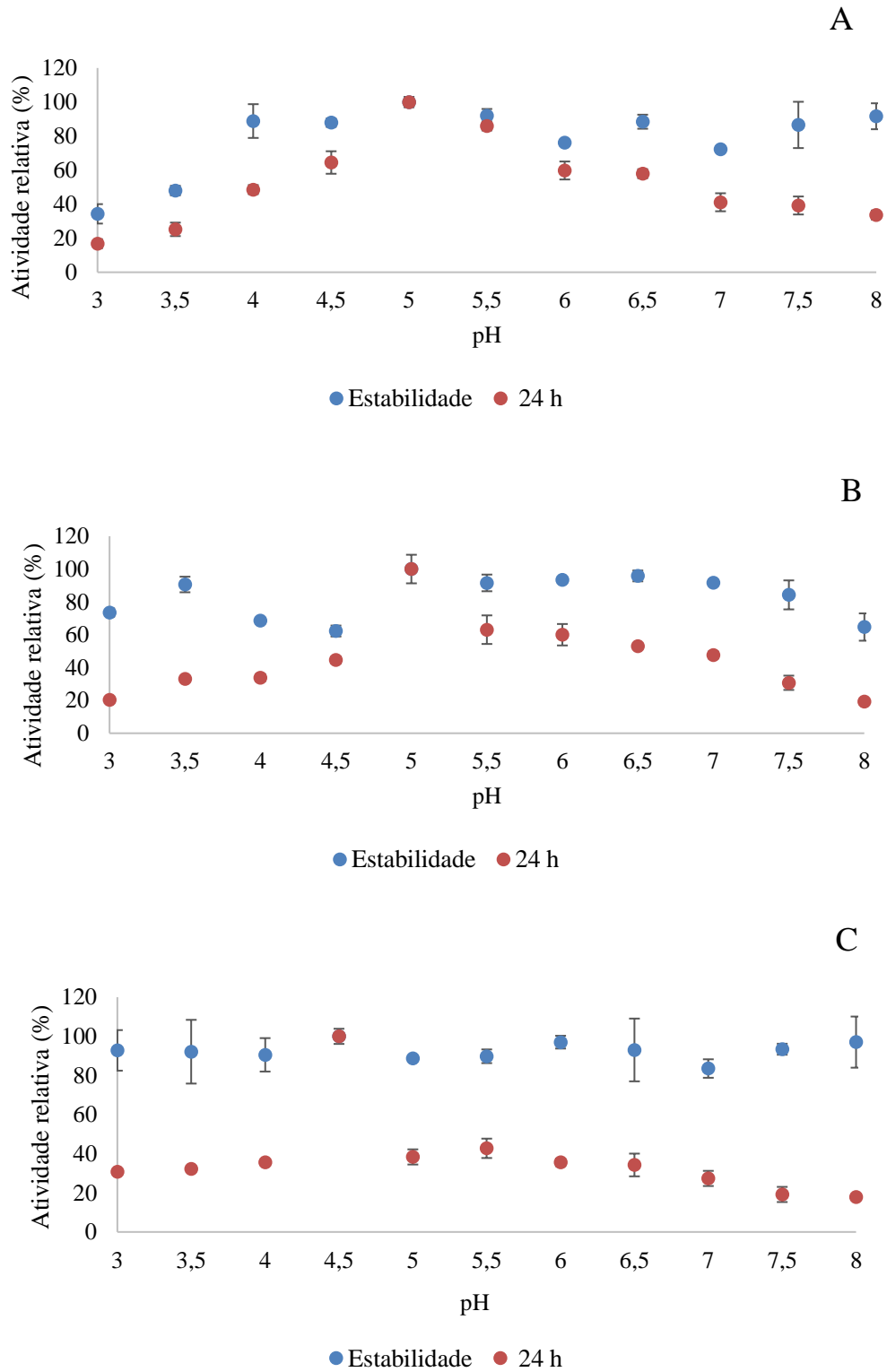
Fonte: Próprio Autor, 2024.

De acordo com Khan et al. (2018), a estabilidade térmica da enzima produzida por *Bacillus paralicheniformis* foi notável até 60 °C após incubação por 1 h. A temperatura ideal mais alta garante maior solubilidade da pectina e, portanto, uma hidrólise mais eficaz. Em acordo com Evangelista et al. (2018) que obtiveram estabilidade térmica a temperatura ótima de 60 °C, onde a atividade enzimática diminuiu pela metade (52,80%) após 6 h; diminuiu para 21,30% após 9 h e inativação completa foi observada após 18 h para poligalacturonase. Um estudo de Rocha et al. (2020) revelaram que *A. niger* exibe atividade de poligalacturonase no decorrer de 2 horas a 30 °C e 40 °C. Os resultados apresentados se baseiam com Pili et al. (2015), que analisaram a estabilidade de poligalacturonase em variadas temperaturas em um período de 15 dias, demonstrando que a enzima poligalacturonase conservou sua atividade acima de 80% por mais de 10 horas a 30 °C e 40 °C. Maciel et al. (2014) alegaram que a temperatura ideal para a enzima poligalacturonase foi de 40 °C. Visto que o presente resultado levou um menor tempo para manter a estabilidade da enzima.

### 5.3.4 Estabilidade frente ao pH

Na Figura 9 são apresentados os resultados para a estabilidade frente ao pH da poligalacturonase produzida por *B. siamensis* BCLB-640, *B. amyloliquefaciens* BCLB-197A e da cultura mista BCLB-197A + BCLB-640. As enzimas foram avaliadas de acordo com suas atividades de hidrólise, para uma faixa de pH entre 3,0 e 8,0 após incubação por 24 horas a 10 °C.

Figura 9. Estabilidade frente ao pH da poligalacturonase produzida a partir das linhagens de *B. siamensis* - BCLB-640 (A), *B. amyloliquefaciens* - BCLB-197A (B) e BCLB-197A + BCLB-640 (C), respectivamente



Fonte: Próprio Autor, 2024.

A estabilidade em uma ampla faixa de pH e por períodos prolongados em altas temperaturas são propriedades importantes para aplicações biotecnológicas. Portanto, a estabilidade em diferentes pH foi semelhante para as poligalacturonases produzidas pelas linhagens *B. siamensis* BCLB-640 e *B. amyloliquefaciens* BCLB-197A. A atividade de poligalacturonase para a linhagem BCLB-640 manteve sua maior estabilidade em pH 5,0 (100,00%) após 24 h de incubação; em pH 5,5 a enzima reteve 85,97%, decaindo a 33,62% em pH 8,0, havendo a redução da atividade enzimática (Figura 9A). Desta forma, a enzima reteve aproximadamente 91,00% da sua atividade após 24 horas de incubação, mostrando que embora a atividade inicial tenha reduzido, a enzima se manteve estável nas condições experimentais estabelecidas. Em pH 3,0 a atividade de poligalacturonase foi observada a 16,78% comparada a atividade inicial, correspondendo a uma estabilidade de 34,50% de atividade.

Para a linhagem BCLB-197A, a atividade inicial de poligalacturonase em pH 3,0 foi de 27,70%, mantendo seu maior pico no pH 5,0 (100,00%), reduzindo até o pH 8,0 (29,73%). Após 24h de incubação, observou-se que a enzima manteve sua atividade acima de 60,00% em todas as condições (Figura 9B). Portanto, em pH alcalino as estabilidades da enzima se mantiveram acima de 90,00% entre os pH 5,5 e 7,5.

A enzima produzida em cultivos mistos de BCLB-197A + BCLB-640 apresentou maior estabilidade em pH 4,5 (100,00%) (Figura 9C). A cultura mista apresentou uma maior estabilidade em pH nos valores mais extremos de pH, comparando com as culturas pura, sendo observada estabilidade acima de 90,00% na faixa de pH analisada.

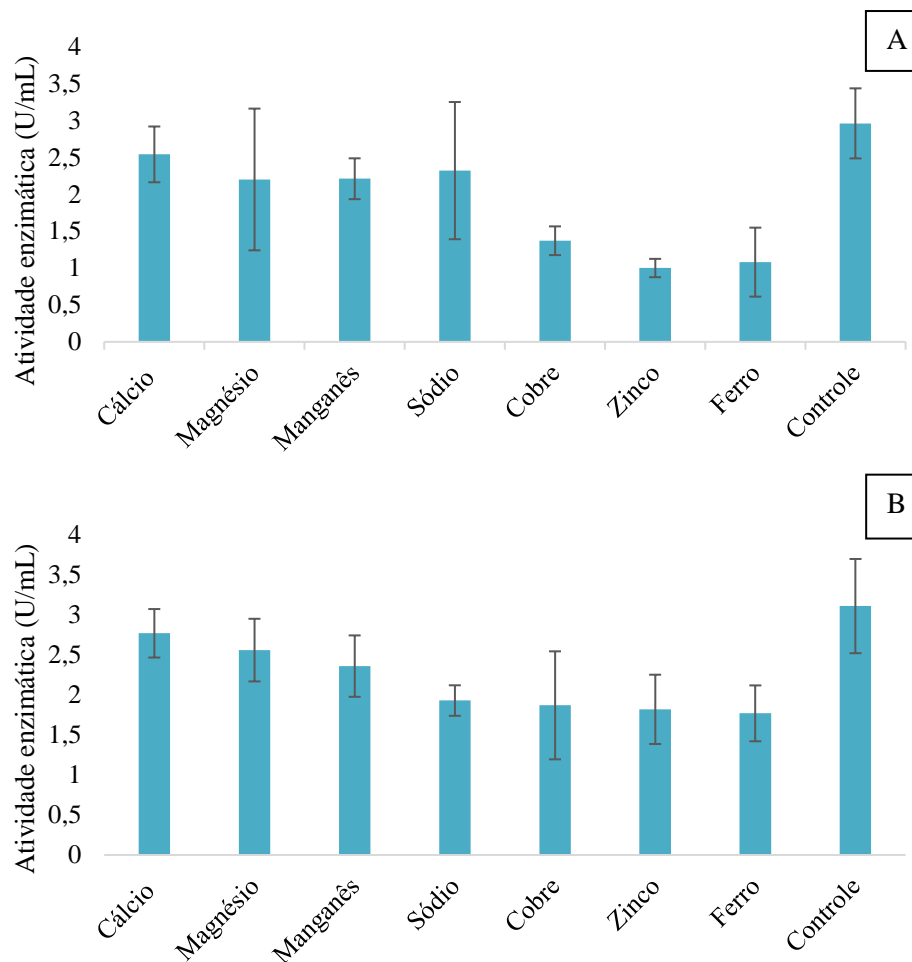
Evangelista et al. (2018) avaliaram a estabilidade da enzima exo-poligalacturonase de *B. licheniformis*, medindo a atividade enzimática residual após incubação em diferentes pH a 60 °C por 30 min. Os autores observaram em seus resultados que a atividade reduziu abaixo de 20,00% após a exposição nos pH entre 2 e 4 e para 84,60% em pH 5. Entre os pH 6 e 10 a enzima manteve a atividade original sem perda significativa, revelando que exo-poligalacturonase de *B. licheniformise* é altamente estável na faixa de pH 5 a 10.

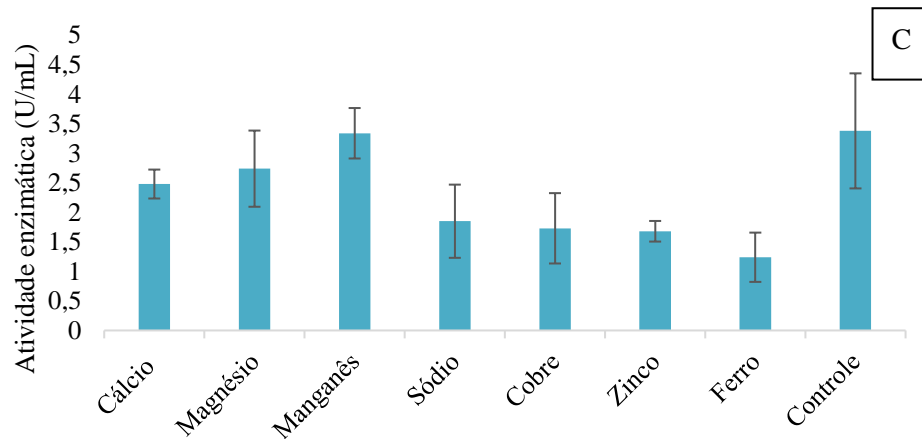
Sheladiya et al. (2022) analisaram a estabilidade de pectato liase produzida por quatro microrganismos em diversos valores de pH. *B. subtilis* obteve maior estabilidade em pH 9,0, mantendo sua atividade de 98,25% e 99,12% em pH 7,0 e pH 8,0, respectivamente, enquanto, as enzimas produzidas por *B. licheniformis*, *Paenibacillus lactis* e *Bacillus sonorensis* apresentaram estabilidade em 61,04% em pH 10,0

### **5.3.5 Efeito dos íons metálicos na atividade da poligalacturonase**

Na Figura 10 são apresentados os resultados do efeito dos íons metálicos na atividade de poligalacturonase produzida por *B. siamensis* BCLB-640, *B. amyloliquefaciens* BCLB-197A e da cultura mista BCLB-197A + BCLB-640. O efeito dos íons metálicos na atividade da enzima foi determinado na presença de 5 mM para cálcio, magnésio, manganês, sódio, cobre, zinco e ferro, na mistura de reação, enquanto a poligalacturonase sem qualquer adição de íons metálicos foi usada como controle. A atividade residual de todas as amostras foi determinada e comparada com o controle.

Figura 10. Efeito dos íons metálicos na atividade de poligalacturonase produzida por *B. siamensis* - BCLB-640 (A), *B. amyloliquefaciens* - BCLB-197A (B) e BCLB-197A + BCLB-640 (C), respectivamente





Fonte: Próprio Autor, 2024.

Os resultados demonstram que os íons metálicos não apresentam efeito de ativação sobre a atividade da enzima; entretanto, a presença dos íons no meio reacional pode apresentar um efeito inibidor da atividade enzimática. A atividade de poligalacturonase foi encontrada tanto para cálcio (2,54 U/mL) quanto para sódio (2,32 U/mL), exibindo 8,66% da atividade de poligalacturonase para cálcio e sódio, respectivamente. Embora, a diferença da atividade de poligalacturonase entre magnésio e manganês seja apenas de 0,45%. Os efeitos prejudiciais da atividade de poligalacturonase foram encontrados na presença de zinco (1,00 U/mL) e ferro (1,08 U/mL). A redução da atividade de poligalacturonase entre zinco e ferro foi de 8,00%. Verificou-se que a enzima requer íons metálicos divalentes para manter sua estrutura ativa para mostrar sua respectiva atividade. Diante disso, o cálcio e o sódio reduziram a atividade de poligalacturonase em relação com a amostra controle (Figura 10A).

A atividade de poligalacturonase não foi afetada em relação aos efeitos dos íons metálicos entre cálcio (2,77 U/mL), magnésio (2,56 U/mL) e manganês (2,36 U/mL), entretanto, mantiveram inferior de acordo com a amostra controle. Contudo, a enzima foi parcialmente reduzida na presença dos íons, sódio, cobre, zinco e ferro. A atividade da enzima aumentou 7,58% da sua atividade inicial na presença de cálcio e magnésio, respectivamente. O resultado mostrou que uma atividade de poligalacturonase ótima de 2,77 U/mL com adição cálcio, além do mais, serviu como controle e outros íons metálicos como magnésio e manganês que do mesmo modo mostraram produções de maneira razoável (Figura 10B).

Na Figura 10C, os íons sódio, cobre, zinco e ferro apresentaram forte efeito inibidor, com redução de aproximadamente 50% na atividade de poligalacturonase. Por outro lado, a adição de manganês ao meio reacional pode promover atividade de poligalacturonase em

relação a amostra controle, apresentando uma atividade diferente quando reagiu com substrato diferente.

Amid et al. (2014) relataram que a atividade da poligalacturonase termoalcalina de *Hylocereus polyrhizus* não foi afetada na presença de manganês, cobalto, cobre e zinco. Por outro lado, a enzima foi completamente inibida na presença de ferro, e 24% de sua atividade inicial foi retida na presença de níquel e alumínio. Ainda neste estudo, a atividade da enzima foi aumentada 112% da atividade inicial na presença de cálcio e magnésio. Mahto et al. (2022), verificaram uma melhora na atividade de poligalacturonase para cálcio e magnésio, com um aumento de 12,21% e 10,95%. Porém, uma inibição da atividade de poligalacturonase foi encontrada na presença de cobre e zinco, verificando uma redução das atividades de poligalacturonase de 5,49% e 6,98%.

Mohandas et al. (2018) revelaram que o sulfato de magnésio aumentou a atividade de poligalacturonase de *Bacillus sonorensis*, em contrapartida, a atividade diminuiu progressivamente com o aumento da concentração de sulfato de magnésio. Segundo Oumer e Abate (2017), a maior atividade de poligalacturonase produzida por *B. subtilis* Btk27 foi observada na presença de magnésio e cálcio. Além disso, foi relatado que houve uma redução significativa na atividade da poligalacturonase na presença de cloreto de sódio.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os citados na literatura com relação aos íons cálcio e magnésio, uma vez que esses íons são essenciais para que aconteça a hidrólise da pectina. Isso pode ser demonstrado pela presença de blocos de grupos de carboxila na pectina, que têm a capacidade de reter as moléculas da enzima e, portanto, impedir que a reação enzimática prossiga (KOSHY; SALAMUN, 2019).

#### **5.4 Análise de Carotenoides**

As linhagens *B. siamensis* BCLB-640, *B. amyloliquefaciens* BCLB-197A e a cultura mista BCLB-197A + BCLB-640, apresentaram produção de poligalacturonase foram testados quanto à sua capacidade de extração de carotenoides em tomate (Tabela 11).

Tabela 11 - Extração de carotenoides assistida por poligalacturonases produzidas por culturas puras de *B. siamensis* BCLB-640 e *B. amyloliquefaciens* BCLB-197A e cultura mista de BCLB-197A + BCLB-640.

Tratamentos	Atividade de Poligalacturonase (U/mL)
BCLB-640	0,87±0,05 <sup>a</sup>
BCLB-197A	1,01±0,03 <sup>a,b</sup>
BCLB-197A + BCLB-640	1,07±0,09 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes em uma mesma coluna são significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.;

Fonte: Próprio Autor, 2024.

A extração de carotenoides pelas poligalacturonases produzidas pelas linhagens em estudo não diferiram estatisticamente entre as amostras ( $p > 0,05$ ). Os maiores rendimentos foram observados nas culturas de BCLB-197A e de BCLB-197A + BCLB-640. A análise foi realizada em uma temperatura de 30 °C, a presente temperatura está entre a faixa de temperaturas dispostas nas extrações de pigmentos, que normalmente é realizada entre 30 a 45 °C. Existem condições ideais de processo que melhoram a recuperação de carotenoides, ou seja; temperatura e pH. Além disso, altas temperaturas podem prejudicar o rendimento devido à desnaturação enzimática (NAM et al., 2016).

Lombardelli et al. (2020), em seu estudo de extração personalizada e sinérgica assistida por enzimas contendo carotenoides em tomates, alcançaram um aumento gradativamente à medida que o tempo de processo foi prolongado, até atingindo valores que variaram de  $1,16 \pm 0,05$  a  $4,30 \pm 0,08$ , a temperatura identificada foi entre 45-55 °C, contudo, não foram encontradas em seus estudos diferenças estatísticas entre as amostras.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do fruto do bacupari, foi possível analisar a presença de atividade de poligalacturonase nas linhagens isoladas desse fruto amazônico. O fruto do tucumã apresentou parcialmente uma atividade enzimática para a linhagem TCMK-109. Porém para a realização da produção de poligalacturonase em culturas puras e mistas a linhagem TCMK-109 proveniente do fruto do tucumã não apresentou aumento de produção eficaz. Desta forma, foram selecionadas duas linhagens que apresentaram potencial para a produção de poligalacturonase em culturas mistas.



As linhagens selecionadas foram a BCLB-640 (*B. siamensis*) e BCLB-197A (*B. amyloliquefaciens*) oram consideradas as mais promissoras para a produção enzimática, entretanto, a misturas entre as duas linhagens (BCLB-197A + BCLB-640) apresentou alta potencialidade, aumentando a atividade de poligalacturonase ( $11,96 \pm 4,28$  U/mL).

A caracterização em temperatura e pH da enzima produzida mostraram que a temperatura de 50 °C e pH 5,0 permitiram a obtenção de maiores atividades poligalacturonases produzidas a partir culturas puras e mistas.

Para o efeito dos íons metálicos na atividade de poligalacturonase, as linhagens BCLB-640, BCLB-197A e a cultura mista (BCLB-197A + BCLB-640), não apresentaram efeitos positivos quando comparado com as amostras controle.

As enzimas produzidas nos cultivos apresentam potencial para aplicações na extração de carotenoides, devendo ser melhores exploradas as condições de uso em outras matérias primas ricas em carotenoides na região do cerrado de Amazônia.

## 7. REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, S. P. H.; FABBRO, D.; KELLY, E.; MARRION, N. V.; PETERS, J. A.; FACCENDA, E.; HARDING, S. D.; PAWSON, A. J.; SHARMAN, J. L.; SOUTHAN, C.; DAVIES, J. A. The concise guide to pharmacology – Enzymes. **British journal of pharmacology**, Vol.174 (S1), p.S272-S359, 2017.
- AMID, M.; MANAP, Y.; ZOHDI, K. Purification and characterization of the thermoalkaline pectinase enzyme from *Hylocereus polyrhizus*. **Eur Food Res Technol.** 239, 21–29, 2014. <https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00217-014-2188-x>
- AMIN, FAIZA.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 122, p. 1017-1026, 2019.
- ANUNCIACÃO, P. C. et al. Identification and quantification of the native carotenoid composition in fruits from the Brazilian Amazon by HPLC–DAD–APCI/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 83, p. 103296, 2019.
- ANDRADE, M. V. V. D.; DELATORRE, A. B., LADEIRA, S. A.; MARTINS, M. L. L. Production and partial characterization of alkaline polygalacturonase secreted by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using pectin and corn steep liquor. **Food Sci Technol**, v.31, n.1: 204-208, 2011.
- ARWA, P. S.; ZERAIK, M. L.; XIMENES, V. F.; DA FONSECA, L. M.; DA SILVA BOLZANI, V., & SILVA, D. H. S. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. **Journal of Ethnopharmacology**, 174, 410-418, 2015.
- ASINELLI, M. E. C.; DE SOUZA, M. C.; MOURÃO, K. S. M. Fruit ontogeny of *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi (Clusiaceae). **Acta Botbras.** v. 25, p. 43–52, 2011.
- BANERJEE, G.; RAY, A. K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 33, n. 2, p. 119- 143, 2017.
- BAGHCHEHSARAEI, B.; NAKHLA, G.; KARAMANEV, D.; MARGARITIS, A. Fermentative hydrogen production by diverse microflora. **Internacional J. Energia de Hidrogênio.** v. 35, p. 5021–5027, 2010.
- BHARDWJ, N.; KUMAR, B.; AGRAWAL, K.; VERMA, P. Current perspectives on the production and applications of microbial cellulases: a review. **Biorrecurso. Bioprocesso.** n. 8, p. 95, 2021. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>
- BHARDWAJ, V.; DEGRASSI, G.; BHARDWAJ, R. K. Microbiais pectinases and their applications in industries: a review. **Polymer.** v. 4, n. 08, 2017.
- BIBI, N.; ALI, S.; TABASSUM, R. Statistical Optimization of Pectinase Biosynthesis from Orange Peel by *Bacillus licheniformis* Using Submerged Fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 7, n. 3, p. 467–481, 2016.

BITTRICH, V.; TRAD, R. J.; CABRAL, F. N.; NASCIMENTO-JR, J. E.; SOUZA, V. C. Clusiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

BRAZIL FLORA GROUP, GOMES-DA-SILVA, J., FILARDI, F. L., BARBOSA, M. R. V., BAUMGRATZ, J. F. A., BICUDO, C. E., ... & CABRAL, T. S. Brazilian Flora 2020: Leveraging the power of a collaborative scientific network. **Taxon**, v. 71, n. 1, p. 178-198, 2022.

CAÑADAS, R. et al. Overview of neoteric solvents as extractants in food industry: A focus on phenolic compounds separation from liquid streams. **Food Research International**, v. 136, p. 109558, 2020.

CARVALHO-SILVA, L. B.; OLIVEIRA, M. DO V.; GONTIJO, V. S.; OLIVEIRA, W. F.; DEROGIS, P. B. M. C.; STRINGHETA, P. C.; NAGEM, T. J.; BRIGAGÃO, M. R. P. L.; SANTOS, M. H. DOS. Antioxidant, cytotoxic and antimutagenic activities of 7-epi-clusianone obtained from pericarp of *Garcinia brasiliensis*. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 180–186, 2012.

CATALDO, V.; ARENAS, N.; LÓPEZ, J.; CAMILO, C.; AGOSIN, E. Sustainable production of  $\beta$ -Xanthophylls in *Saccharomyces cerevisiae*. In Mic Eng. USA, 2018.

CATALKAYA, G.; KAHVECI, D. Optimization of enzyme-assisted extraction of lycopene from industrial tomato residues. **Technology of Separation and Purification**. v. 219, p. 55-63, 2019.

COLMÁN-MARTÍNEZ, M. et al. A new method to simultaneously quantify the antioxidants: carotenes, xanthophylls, and vitamin A in human plasma. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

CHOWDHURY, T. I.; JUBAYER, F.; UDDIN, B.; AZIZ, G. Production and characterization of pectinase enzyme from *rhizopus oryzae*. **Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences**, Vol.11 (1), p.641-651, 2017.

DANALACHE, F.; MATA, P.; ALVES, V. D.; MOLDÃO-MARTINS, M. Chapter 10: Enzyme-assisted extraction of fruit juices. In: G. Rajauria & B. K. Tiwari (Eds.), **Fruit Juices**. p. 183-200. Elsevier, 2018.

DAS, S.; NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. Integrated strategies for enzyme assisted extraction of bioactive molecules: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 899-917, 2021.

DESHAVATH, N. N.; MUKHERJEE, G.; GOUD, V. V.; VEERANKI, V. D.; & SASTRI, C. V. Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. **International journal of biological macromolecules**, v. 156, p. 180-185, 2020.

DELGADO-PELAYO, R.; GALLARDO-GUERRERO, L.; HORNERO-MÉNDEZ, D. Carotenoid composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. **Food chemistry**, v. 199, p. 165-175, 2016.

DE MELO, A. M., ALMEIDA, F. L. C., DE MELO CAVALCANTE, A. M., IKEDA, M., BARBI, R. C. T., COSTA, B. P., & RIBANI, R. H. *Garcinia brasiliensis* fruits and its by-products: Antioxidant activity, health effects and future food industry trends—A bibliometric review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 112, p. 325-335, 2021.

DE MELO, A. M.; BARBI, R. C. T.; COSTA, B. P.; IKEDA, M.; CARPINÉ, D.; RIBANI, R. H. Valorization of the agro-industrial by-products of bacupari (*Garcinia brasiliensis* (Mart.)) through production of flour with bioactive properties. **Food Bioscience**, v. 45, 101343, 2022.

DE MELO, A. M.; COSTA, B. P.; IKEDA, M.; RIBANI, R. H. Identification of bioactive compounds, morphology, and nutritional composition of bacupari (*Garcinia brasiliensis* (Mart)) pulp powder in two stages of maturation-A short communication. **Food Chemistry**, 133279, 2022.

DEMENCIANO, S. D. C.; SILVA, M. C. B. L. E.; ALEXANDRINO, C. A. F.; KATO JUNIOR, W. H.; FIGUEIREDO, P. D. O.; GARCEZ, W. S.; BOGO, D. Antiproliferative activity and antioxidant potential of extracts of *Garcinia gardneriana*. **Molecules**, v. 25, n. 14, 3201, 2020.

EASTWOOD, M.A. The physiological effect of dietary fiber: an update. **Annu. Rev. Nutr.** v. 12, p. 19-35, 1992.

EVANGELISTA, D. E.; ARAÚJO, E. A. DE; NETO, M. O.; KADOWAKI, M. A. S.; POLIKARPOV, I. Biochemical characterization and low-resolution SAXS structure of an exopolysaccharidase from *Bacillus licheniformis*. **New Biotechnology**, v. 40, n. September 2017, p. 268–274, 2018.

FAROOQ, M. A. et al. Biosynthesis and industrial applications of  $\alpha$ -amylase: a review. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 1281-1292. 2021.

FILARDI, F. L. R.; BARROS, F. D.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E.; CAVALCANTI, T. B.; COELHO, M. A. N.; CAVALHEIRO, L. Brazilian Flora 2020: innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**, v. 69, p. 1513-1527, 2018.

FIGUEIREDO, S.A.; VILELA, F.M.P.; DA SILVA, C.A.; CUNHA, T.M.; DOS SANTOS, M.H.; FONSECA, M.J.V. In vitro and in vivo photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 131, p. 65-73, 2014.

GARG, G.; SINGH, A.; KAUR, A.; SINGH, R.; KAUR, J.; MAHAJAN, R. G, G. et al. Microbial pectinases: an ecofriendly tool of nature for industries. **Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

GUIMARÃES, C. A. N.; GLIENKE, N. N.; SILVA GALEANO, R. M.; RULLER, R.; ZANOELO, F. F.; MASUI, D. C.; GIANNESI, G. C. Polygalacturonase from *Aspergillus japonicus* (PGAj): Enzyme production using low-cost carbon source, biochemical properties and application in clarification of fruit juices. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 39, n. November 2021, 2022.

GONTIJO, V.S.; DE SOUZA, T.C.; ROSA, I.A.; SOARES, M.G.; DA SILVA, M.A.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, M.H. Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents from the *Garcinia brasiliensis* epicarp. **Food chemistry**. v. 132, n. 3, p. 1230-1235, 2012.

HAILE, M.; KANG, W. H. ISOLATION, identification, and characterization of pectinolytic yeasts for starter culture in coffee fermentation. **Microorganisms**, v.7, n.10, 401, 2019.

HAILE, Setegn; AYELE, Abate. Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications. **The Scientific World Journal**, v. 2022, 2022.

HIGBY, W.K. A simplified method for determining some aspects of carotenoid distribution in natural and carotene-fortified orange juice. **Journal of Food Science**. v. 27, n. 1, p. 42-49, 1962.

HOONDAL, G. S.; TIWARI, R. P., TEWARI, R.; DAHIYA, N.; BEG, Q. K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.59, n. 4-5:409-418, 2002.

JALIL, M. T. M.; IBRAHIM, D. Partial purification and characterisation of pectinase produced by *Aspergillus niger* LFP-1 grown on pomelo peels as a substrate. **Tropical Life Science Research**. v. 32(1), p. 1–22, 2021.

JAYANI, R. S.; SHUKLA, S. K.; GUPTA, R. Screening bacterial strains for polygalacturonase activity: its production by *Bacillus sphaericus* (MTCC 7542). **Enzyme Research** 2010.

JAYARAJ, J.; DEVLIN, R.; PUNJA, Z. Metabolic engineering of novel ketocarotenoid production in carrot plants. **Transgenic research**, v. 17, n. 4, p. 489-501, 2008.

JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Process Biochemistry**, v.40, n.9, 2931–2944, 2005.

JOSHI, M.; NERURKAR, M.; ADIVAREKAR, R. Characterization, kinetic, and thermodynamic studies of marine pectinase from *Bacillus subtilis*. **Prep Biochem Biotechnol**, v.45, n.3: 205- 220, 2015.

KASHYAP, D.R.; VOHRA, P.K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresour. Technol.** 77, 215–227, 2001.

KAVUTHODI, B.; SEBASTIAN, D. Review on bacterial production of alkaline pectinase with special emphasis on *Bacillus* species. **Bioscience Biotechnology Research Communications**, v.11, n.1, 18–30, 2018.

KHAN, M. M.; CHOI, Y. S.; KIM, Y. K.; YOO, J. C. Immobilization of an alkaline endopolygalacturonase purified from *Bacillus paralicheniformis* exhibits bioscouring of cotton fabrics. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 10, p. 1425–1436, 2018.

KOSHY, MI.; SALAMUN, D. Effect of *Bacillus tequilensis* SALBT crude extract with pectinase activity on demucilage of coffee beans and juice clarification. **Journal of basic**

**microbiology**, Vol.59 (12), p.1185-1194, 2019. <https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.1002/jobm.201900321>

KUMAR, S. Role of enzymes in fruit juice processing and its quality enhancement. **Adv. Appl. Sci. Res.** v. 6, n. 6, p.114-124, 2015.

KUMAR, G. P.; SUNEETHA, V. Caracterização da pectina liase e poligalacturonase do novo *Bacillus cereus* GS-2 isolado de Chittoor e Vellore Fruit Industrial Dump Sites por SEM, sequenciamento de 16SrRNA, troca iônica, SDS e análise de HPLC. **J Pure Appl Microbiol**, 10 (1): 741-749. 2016.

KUVVET, C.; UZUNER, S.; CEKMECELIOGLU, D. Improvement of Pectinase Production by Co-culture of *Bacillus* spp. Using Apple Pomace as a Carbon Source. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 5, p. 1241–1249, 2019.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, vol. 227, p. 680-685, 1970.

LI, Q.; LOMAN, A.; CALLOW, N. V.; ISLAM, S. M.; JU, LU-KWANG. Leveraging pH profiles to direct enzyme production (cellulase, xylanase, polygalacturonase, pectinase  $\alpha$ -galactosidase, and invertase) by *Aspergillus foetidus*. **Biochemical engineering journal**, Vol.137, p.247-254, 2018.

LIU, X.; KOKARE, C. **Microbial enzymes of use in industry**. In: BRAHMACHARI, G. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Londres: Academic Press, 2017. p. 267- 298.

LIU, Chenghai et al. Improvement of anthocyanins rate of blueberry powder under variable power of microwave extraction. **Separation and Purification Technology**, v. 226, p. 286-298, 2019.

LOMBARDELLI, C.; LIBURDI, K.; BENUCCI, I.; ESTI, M. Tailored and synergistic enzyme-assisted extraction of carotenoid-containing chromoplasts from tomatoes. **Food and Bioproducts Processing**. v. 121, p. 43-53, 2020.

MACIEL, M. H. C.; HERCULANO, P. N.; FERNANDES, M. J. S.; PORTO, T. S.; LIMA, J. S.; MAGALHÃES, O. M. C.; SILVA, L. R. C.; PORTO, A. L. F.; MOREIRA, K. A.; MOTTA, C. M. S. Pectinolytic complex production by *Aspergillus niger* URM 4645 using yellow passion fruit peels in solid state fermentation. **Afr. J. Biotecnologia**, V. 13, 2014. DOI: 10.5897/AJB2014.13880

MACKENZIE, A. K. et al. A polysaccharide utilization locus from an uncultured *Bacteroidetes* phylotype suggests ecological adaptation and substrate versatility. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 1, p. 187-195, 2015.

MADHAVAN, Aravind et al. Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications. **Bioresource technology**, v. 245, p. 1304-1313, 2017.

MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 65-70, 2007.

MANOOCHEHRI, H.; HOSSEINI, N. F.; SAIDIJAM, M.; TAHERI, M.; REZAEI, H.; NOURI, F. A review on invertase: Its potentials and applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, n. April, p. 101599, 2020.

MAHTO, R. BALAK.; YADAV, M.; BHUNIA, B. A statistical approach for production of pectinase through optimization of process factors using mutant strain of *Bacillus subtilis*. **Bulletin of Pure & Applied Sciences- Zoology**. v. 39, p. 41-53, 2020.

MAHTO, R. B.; YADAV, M.; MUTHURAJ, M.; SHARMA, A. K.; BHUNIA, B. Biochemical properties and application of a novel pectinase from a mutant strain of *Bacillus subtilis*. **Biomass Conversion and Biorefinery**, n. 0123456789, 2022. <https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s13399-021-02225-y>

MATOS, K.A.N.; LIMA, D.P.; BARBOSA, A.P.P.; MERCADANTE, A.Z.; CHISTE, R.C. Tucumã (*Astrocaryum vulgare*) and peach palm (*Bactris gasipaes*) bark are by-products classified as very high sources of carotenoids. **Food Chemistry**. v. 272, p. 216-221, 2019.

MARTINS, F.T.; DORIGUETTO, A.C.; DE SOUZA, T.C.; DE SOUZA, K.R.; DOS SANTOS, M.H.; MOREIRA, M.E.; BARBOSA, L.C. Composition and anti-inflammatory and antioxidant activity of the volatile oil from the peel of the fruit of *Garcinia brasiliensis*. **Chemistry & Biodiversity**. v. 5, no. 2, p. 251-258, 2008.

MELO, A. M.; BARBI, R. C. T.; COSTA, B. P.; IKEDA, M.; CARPINÉ, D.; RIBANI, R. H. Valorization of the agro-industrial by-products of bacupari (*Garcinia brasiliensis* (Mart.)) through production of flour with bioactive properties. **Food Bioscience**. p. 101343, 2022.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, vol. 31, n. 3, 1959.

MIRANDA, P. H. S. et al. A scientific approach to extraction methods and stability of pigments from Amazonian fruits. **Trends in Food Science & Technology**, v. 113, p. 335-345, 2021.

MOHANDAS. A.; RAVEENDRAN. S.; PARAMESWARAN B.; ABRAHAM. A.; ATHIRA. R. S. R.; MATHEW. A. K. Pectinase production from *Bacillus sonorensis* MPTD1. **Tecnologia Alimentar Biotecnologia**. 56: 110-6, 2018.

MUNIZ, F.H. *Garcinia* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB6851> Acesso em 15 de agosto de 2022.

MWAURAH, P. W., KUMAR, S., KUMAR, N., ATTKAN, A. K., PANGHAL, A., SINGH, V. K., GARG, M. K. Novel oil extraction technologies: Process conditions, quality parameters, and optimization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.19, n.1, 3–20, 2019.

MUSSAGY, C. U. et al. Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1095-1114, 2019.

NAM, V. P.; PHONG, L. Q.; LAN, T. H.; THUY, P. T. **Improvement of lycopene extraction from tomatoes by enzyme-assisted treatment** *J. Ciência Alimentar*. Tecnologia. V. 54, 2016.

NAWAWI, M. H.; ISMAIL, K. I.; SA'AD, N.; MOHAMAD, R.; TAHIR, P. M.; ASA'ARI, A. Z.; SAAD, W. Z. Optimisation of Xylanase–Pectinase Cocktail Production with *Bacillus amyloliquefaciens* ADI2 Using a Low-Cost Substrate via Statistical Strategy. **Fermentation**, v. 8, n. 3, 2022.

NGALIMAT, M. S. et al. A review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 614, 2021.

NEVES, L.C.; TOSIN, J.M.; BENEDETTE, R.M.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region. **Food Chemistry**. 174, 188–196, 2015.

NIGAM, P.S.; PANDEY, A. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization**. Springer, Netherlands, 2009.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), IUBMB.ORG. 2021.

OUMER, O. J.; ABATE, D. F. Characterization of pectinase from *Bacillus subtilis* Btk 27 strain and its potential application in mucilage removal from coffee beans. **Enzima Res.** 1 – 7. 2017. <https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.1155/2017/7686904>

OUMER, O. J.; ABATE, D. F. Screening and Molecular Identification of Pectinase Producing Microbes from Coffee Pulp. **BioMed research international**, p.2961767-7, 2018.

OUMER, O. J. Pectinase: Substrate, Production and their Biotechnological Applications. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 1007–1014, 2017.

PACHAPUR, Vinayak Laxman et al. Seed pretreatment for increased hydrogen production using mixed-culture systems with advantages over pure-culture systems. **Energies**, v. 12, n. 3, p. 530, 2019.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, n. 2, p. 153-162, 2000.

PANIC, M. V.; GUNJEVIC, G.; CRAVOTTO, I.; REDOVNKOVIC, R. Tecnologia que permitem a extração de antocianinas de bagaço de uva usando solventes eutéticos profundos naturais em lotes de até meio litro de extração de antocianinas de bagaço de uva usando NADES. **Food Chemistry**, p. 125185, 2019.

PATIDAR, M. K.; NIGHOJKAR, S.; KUMAR, A.; NIGHOJKAR, A. Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: A review. **Biotech**, v.8, n.199, 1–24, 2018.



PRATHYUSHA, K.; SUNEETHA, V. Bacterial pectinases and their potent biotechnological application in fruit processing/ juice production industry: a review. **J Phytol**, v.3, n.6, 2011.

PAZ, W. H. P.; DE ALMEIDA, R. A.; BRAGA, N. A.; DA SILVA, F. M. A.; ACHO, L. D. R.; LIMA, E. S.; BOLETI, A. P. A.; DOS SANTOS, E. L.; ANGOLINI, C. F. F.; BATAGLION, G. A.; KOOLEN, H. H. F. Remela de cachorro (*Clavija lancifolia* Desf.) fruits from South Amazon: Phenolic composition, biological potential, and aroma analysis. **Food research international**, 2018-07, Vol.109, p.112-119

PEREIRA, E.; FERREIRA, M. C.; SAMPAIO, K. A.; GRIMALDI, R.; MEIRELLES, A. J. DE A., & MAXIMO, G. J. (2019). Physical properties of Amazonian fats and oils and their blends. *Food Chemistry*, 278(June 2018), 208–215. <https://doi-org.ez6.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.foodchem.2018.11.016>

PINTO, T. Z.; FERREIRA, C. J.; CARRIÇO, C.; LEAL, C. R.; DOS SANTOS, B. F.; MENDONÇA, V. M.; BERENGER, P. R.; FIGUEIREDO, A. L.; RAQUEL, M. Acaricidal effects of seven Brazilian plant extracts. **Revista Colombiana de Entomología**, Vol.44 (1), p.44-47, 2008.

PRAJAPATI, J.; DUDHAGARA, P.; PATEL, K. Production of thermal and acid-stable pectinase from *Bacillus subtilis* strain BK-3: Optimization, characterization, and application for fruit juice clarification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, n. March, p. 102063, 2021.

PILI, J.; A.; DANIELLI, A.; ZENI, J.; TRENTINI, M. M. S.; CANSIAN, R. L.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E. Utilization of Orange Peel, Corn Steep Liquor, and Parboiled Rice Water in the Production of Polygalacturonase from *Aspergillus niger*. **Ind. Biotecnologia**, v. 11, n. 5, 2015. DOI: 10.1089/ind.2015.0011

REBELLO, S.; MOHANDAS, A.; MATHACHAN, A. E.; SINDHU, R. B. P.; PANDEY, A. Recent advancements in the production and application of microbial pectinases: an overview. **Rev Environ Sci Biotechnol**. p. 381-394, 2017.

REDDY, P. P.; REDDY, G. S. N.; SULOCHANA, M.B. Screening of  $\beta$ -fructofuranosidase producers with high transfructosylation activity and its 3 experimental run studies on reaction rate of enzyme. **Journal of Biological Sciences**, vol. 10, n.3, p. 237-241, 2010.

REGO, D.; GAYESKI, L.; TRES, G. A.; CAMERA, F. D.; ZENI, J. Produção Microbiológica de Enzimas: uma Revisão Microbiological Production of Enzymes: a Review. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.1, p.9232-9254, 2021.

ROCHA, A. P.; MATOS, V. P.; DE MOURA SENA, L. H.; PACHECO, M. V.; FERREIRA, R. L. C. Methods for dormancy overcoming of *Garcinia gardneriana* zappi seeds/metodos para superacao da dormencia em sementes de *Garcinia gardneriana* zappi. **Ciência florestal**, Vol.28 (2), 2018.

ROCHA, A. P. Métodos para superação da dormência em sementes de *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 2, p. 505-514, abr.- jun., 2018; ISSN 1980-5098.

ROCHA, J. C.; ARAÚJO, J. S.; PAIVA, W. K. V. de.; RIBEIRO, E. S. S.; PADILHA, C. E. A.; ASSIS, C. F. de.; SANTOS, E. S. dos.; MACÊDO, G. R. de.; JUNIOR, F. C. de S. Yellow mombin pulp residue valorization for pectinases production by *Aspergillus niger* IOC 4003 and its application in juice clarification, *Biocatal. Agrícola. Biotecnologia*, 2020.

RODRIGUEZ-AMAYA, D B. Natural food pigments and colorants. In: *Bioactive molecules in food*. Springer, Cham, p. 867-901, 2019.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Update on natural food pigments-A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*, v. 124, p. 200-205, 2019.

RUIZ, H. A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; HERNANDEZ-ALMANZA, A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. **Pectinolytic Enzymes**. In A. Pandey, S. Negi, C. R. Soccol (Eds.), *Current developments in biotechnology and bioengineering - production, isolation and purification of industrial products*, 2017 pp. 47–71.

SAGRILLO, M. R.; GARCIA, L. F. M.; DE SOUZA FILHO, O. C.; DUARTE, M. M. M. F.; RIBEIRO, E. E.; CADONÁ, F. C. Tucumã fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. *Food Chemistry*, 173, 741–748. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.067>.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. Carotenoid extraction methods: A review of recente developments. *Food chemistry*, v. 240, p. 90-103, 2018.

SANCHEZ-CAMARGO, A.P.; MONTERO, L.; STIGER-POUVREAU, V.; TANNIOU, A.; CIFUENTES, A.; HERRERO, M., et al. Considerations on the use of enzyme-assisted extraction in combination with pressurized liquids to recover bioactive compounds from algae. *Food Chem.* v. 1, n. 192, 67-74, 2016.

SAKAI, Takuo; OKUSHIMA, Minoru. Purification and crystallization of a protopectin-solubilizing enzyme from *Trichosporon penicillatum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 46, n. 3, p. 667-676, 1982.

SAKAI, T. Degradation of pectins. *Microbial degradation of natural products.*, p. 57-81, 1992.

SAKAI, Takuo et al. Pectin, Pectinase, and Protopectinase: Production, Properties, and Applications. *Advances in applied microbiology*, v. 39, p. 213-294, 1993.

SAKAMOTO, Tatsuji; HOURS, Alberto-Roque; SAKAI, Takuo. Purification, characterization, and production of two pectic transeliminases with protopectinase activity from *Bacillus subtilis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 58, n. 2, p. 353-358, 1994.

SANTA-CECÍLIA, F. V.; VILELA, F. C.; ROCHA, C. Q. DA; DIAS, D. F.; CAVALCANTE, G. P.; FREITAS, L. A. S.; SANTOS, M. H. DOS; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, n. 2, p. 467–473, 2011.

SANTOS, I. L. DOS.; ALMEIDA, F. DE.; ELIAS, F. C. P. **Prospecção de microrganismos de frutos amazônicos produtores de pectinases para aplicação industrial**. Dissertação de mestrado acadêmico – Universidade Federal do Tocantins – Campus Palmas – Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências e Tecnologia de Alimentos, 2022.

SATAPATHY, S. et al. Biochemical Prospects of Various Microbial Pectinase and Pectin: An Approachable Concept in Pharmaceutical Bioprocessing. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, n. 117, 2020.

SHARMA, N.; RATHORE, M.; SHARMA, M. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 1, p. 45-60, 2013.

SHELDON, R. A., & PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, 42(15), 6223–6235, 2013.

SHRESTHA, S.; RAHMAN, M. S.; QIN, W. New insights in pectinase production development and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 9069-9087, 2021.

SILVA, R.S.; MARB, C. L.; KLUCZKOVSKIC, J. M.; FIGUEIREDO, A. M.; SORAIA, V. J. A.; BORGES, A. M. Physicochemical properties of tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) powders with different carbohydrate biopolymers, **LWT - Food Science and Technology**. p.79–86. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.047>

SILVA, R. D. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R.; Comparison methods for the determination of reducers sugars and total in honey. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos (Brazil)**, v. 23, p. 337-341, 2003.

SINGH, P.; KUMAR, S. **Microbial enzyme in food biotechnology**. In M. Kuddus (Ed.), *Enzymes in food biotechnology*, p. 19 – 28. Elsevier, 2019.

SIRIDEVI, G. B., HAVARE, D., BASAVARAJ, K., MURTHY, P. S. Coffee starter microbiome and in-silico approach to improve Arabica coffee. **LWT - Food Science and Technology**, 114, 108382, 2019.

SOARES, M. M.; SILVA, R. D.; GOMES, E. Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. **Revista de microbiologia**, v. 30, n. 4, p. 299-303, 1999.

SONAR, M.P.; RATHOD, V.K. Microwave assisted extraction (MAE) used as a tool for rapid extraction of Marmelosin from *Aegle marmelos* and evaluations of total phenolic and flavonoids content, **antioxidant and anti-inflammatory activity Chemical Data Collections**, v. 30, p. 100545, 2020.

SONG, Jiangfeng et al. Optimization of trans lutein from pumpkin (*Cucurbita moschata*) peel by ultrasound-assisted extraction. **Food and Bioproducts Processing**, v. 107, p. 104-112, 2018.

SOHAIL, M; LATIF, Z. Phylogenetic analysis of polygalacturonase-producing *Bacillus* and *Pseudomonas* isolated from plant waste material. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 9, n. 1, 2016.

SOUZA, Thaiza SP; KAWAGUTI, Haroldo Yukio. Cellulases, hemicellulases, and pectinases: Applications in the food and beverage industry. **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, n. 8, p. 1446-1477, 2021.

SOUZA, T. C., DOS SANTOS SOUZA, E., DOUSSEAU, S., DE CASTRO, E. M., MAGALHÃES, P. C. Seedlings of *Garcinia brasiliensis* (Clusiaceae) subjected to root flooding: Physiological, morphoanatomical, and antioxidant responses to the stress. *Aquatic Botany*, 111, 43-49, 2013.

SOUZA, J. V. B.; SILVA, E. S.; MAIA, M. L. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; **Process Biochem.** 2003, 39, 455.

SUJIN, L.; YANG, T.; DANDAN, L.; GUANGZHONG, W.; JIANZHONG, ZHOU.; SIVAKUMAR, M.; YONGBIN, H.; WAI SIONG, C. Fermentation of blueberry juices using autochthonous lactic acid bacteria isolated from fruit environment: Fermentation characteristics and evolution of phenolic profiles. **Chemosphere (Oxford)**, Vol.276, p.130090-130090, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130090>

SHARMA, N.; RATHORE, M.; SHARMA, M. Microbial pectinase: sources, characterization and applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 1, p. 45-60, 2013.

SHELADIYA, P.; KAPADIA, C.; PRAJAPATI, V.; ALI EL ENSHASY, H.; ABD MALEK, R.; MARRAIKI, N.; ZAGHLOUL, N. S. S.; SAYYED, R. Z. Production, statistical optimization, and functional characterization of alkali stable pectate lyase of *Paenibacillus lactis* PKC5 for use in juice clarification. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2022.

SRIAMORNSAK, P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review. **Silpakorn Univ. Int. J.** 3, 206-228, 2003.

TAPRE, A. R.; JAIN, R. K. Pectinases: enzymes for fruit processing industry. *International Food Research Journal*, v. 21 n.2, p. 447-453, 2014.

THAKUR, Akhilesh et al. Production, purification, and characterization of polygalacturonase from *Mucor circinelloides* ITCC 6025. **Enzyme research**, v. 2010, 2010.

TOTI, E. et al. Non-provitamin A and provitamin A carotenoids as immunomodulators: recommended dietary allowance, therapeutic index, or personalized nutrition?. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2018.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: industrial applications and prospects. **Química Nova**. v.30, p. 388-394, 2007.

UZUNER, S.; CEKMECELIOGLU, D. Increased pectinase production by optimizing the fermentation conditions of *Bacillus subtilis* growing in hazelnut husk hydrolyzate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, p. 62-67, 2015.

VALDUGA, Eunice et al. Carotenoids production: microorganisms as source of natural dyes. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009.

VAZ, R. P.; VICI, A. C.; TEIXEIRA, M. P.; LOURDES, M.; MAGALHÃES, P. O.; FILHO, E. X. F, Immobilization studies of a pectinase produced by *Aspergillus terreus*. **Biotechnology and applied biochemistry**, Vol.68 (1), p.197-208, 2021.

VESPERMANN, K.A.; PAULINO, B.N.; BARCELOS, M.C.; PESSÔA, M.G.; PASTORE, G.M.; MOLINA, G. Biotransformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene into flavoring compounds. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 5, p. 1805-1817, 2017.

VIANNA, S. A. *Astrocaryum* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22086>. Acesso em, v. 23, 2021.

YU, P.; XU, C. Production optimization, purification and characterization of a heat-tolerant acidic pectinase from *Bacillus* sp. **International journal of biological macromolecules**, Vol.108, p.972-980, 2018.

ZAPPI, D.C. et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015.

ZHANG, G.; LI, S.; XU, Y.; WANG, J.; WANG, F.; XIN, Y.; SHEN, Z.; ZHANG, H.; MA, M.; LIU, H. Production of alkaline pectinase: A case study investigating the use of tobacco stalk with the newly isolated strain *Bacillus tequilensis* CAS-MEI-2-33. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2019.

ZIA, S. et al. An inclusive overview of advanced thermal and nonthermal extraction techniques for bioactive compounds in food and food-related matrices. **Food Reviews International**, v. 38, n. 6, p. 1166-1196, 2022.