

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ARMSTRONG DOS SANTOS LEAL

PRODUÇÃO DE PECTINASES FÚNGICAS A PARTIR DO EXTRATO
AQUOSO DA ALGAROBA (*Prosopis juliflora* (SW) DC)

JOÃO PESSOA – PB

2024

ARMSTRONG DOS SANTOS LEAL

**PRODUÇÃO DE PECTINASES FÚNGICAS A PARTIR DO EXTRATO AQUOSO DA
ALGARROBA (*Prosopis juliflora* (SW) DC)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a. Andréa Farias de Almeida.

JOÃO PESSOA – PB

2024

ARMSTRONG DOS SANTOS LEAL

**PRODUÇÃO DE PECTINASES FÚNGICAS A PARTIR DO EXTRATO AQUOSO DA
ALGAROBA (*Prosopis juliflora* (SW) (DC))**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: 29 de fevereiro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Andréa Farias de Almeida (CBiotec/UFPB)
(Orientadora)

Dr.^a. Cristiani Viegas Brandão Grisi (Pós-Doc do PPGEQ/UFPB)
(Examinadora Interna ao Programa)

Prof.^a. Dr.^a. Adna Cristina Barbosa de Sousa (CBiotec/UFPB)
(Examinadora Externa ao Programa)

Prof.^a. Dr.^a. Flávia de Oliveira Paulino (CBiotec/UFPB)
(Examinadora Externa ao Programa)

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L435p Leal, Armstrong dos Santos.

Produção de pectinases fúngicas a partir do extrato aquoso da Algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) (DC)) / Armstrong dos Santos Leal. - João Pessoa, 2024.
87 f. : il.

Orientação: Andréa Farias de Almeida.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Engenharia química. 2. Enzimas fúngicas. 3. *Paecilomyces* sp. 4. *Aspergillus* sp. 5. *Penicillium* sp. 6. Substratos de baixo custo. 7. Isolados fúngicos. I. Almeida, Andréa Farias de. II. Título.

UFPB/BC

CDU 66.0(043)

AGRADECIMENTOS

A **Deus de Abraão, Isaque e Jacó** e, ao meu **Senhor e Salvador Jesus Cristo**, a quem rendo-lhes toda a minha gratidão, honras e glórias e louvores, pelo dom da vida, e a exatamente, tudo que conquistei na minha vida, pois sem o meu Deus único, nada disso seria possível acontecer, uma vez que foi ele, o meu Deus eterno, que me permitiu vivenciar a conclusão deste sonho.

À minha amada avó, **Mariam Leal**, inesquecível, que não pôde estar agora neste momento viva, fisicamente, mas permanece na minha memória para o resto da minha vida (*in memoriam*).

A minha querida esposa, **Marcela Leite Leal**, a minha companheira de todos os momentos, a qual sempre esteve ao meu lado, me dando forças e me acompanhado em tudo, simplesmente a amo muito, assim como, a minha **filha Mairla Leite dos Santos Leal**, a quem vêm me inspirando trilhar meus passos, e muitas vezes quando estou cansando e fadigado das lutas diárias, é quem sempre está me esperando em casa, juntamente com a minha esposa, sempre de braços abertos, sendo meu refúgio e de renovo, amo muito vocês, e por vocês a minha luta diária.

Aos meus pais, **dona Elma dos Santos Leal**, e o **senhor Jackson Pedro Leal**, os quais são os responsáveis em lançarem as bases da preparação da vida, para isso trabalham muito para prover o melhor possível para mim e meus irmãos (**Harrison, Junior e Jarlington**, que bom que nesta data ambos estão entre nós comemorando mais essa conquista.

Agradecer também ao **Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química – PPGEQ/CT/UFPB**, por ter aberto as portas, nisto já aproveito para agradecer a primeira pessoa que nos deu as boas-vindas a pós-graduação que ora me refiro, o dedicado secretário do PPGEQ, aquele que não mede esforços para ajudar os alunos na condução durante o curso, meu prezado amigo **Fabício**, que inclusive, me convidou para fazer parte do colegiado do curso, sentimento de gratidão eterna. Assim como também agradecer a Nicolas (que também parte da secretaria do PPGEQ). Ao passo agradeço queridos corpo docente do programa, pela dedicação e respeito que tiveram com todos alunos, nos oportunizando a voar mais alto academicamente e profissionalmente, a começar pela **Professora Dra. Andréa Farias de Almeida**, que é coordenadora do PPGEQ e a minha orientadora também, a quem a tenho uma gratidão eterna que me abriu as portas do seu laboratório, sendo também baluarte para que chegássemos até

final, pois não permitiu também que desistisse de meu sonho no momento crítico da caminhada – gratidão eterna!

Ao caro professor Nagel, um professor dedicado ao sacerdócio de ensinar, um grande mestre, que nos acolheu tão bem no curso, inclusive foi este digno professor que ministrou a nossa aula inaugural, a este querido docente, meus sinceros agradecimentos! Assim como os demais queridos mestres, que integram esse maravilhoso corpo docente - PPGEQ, muito obrigado por tudo!

Aos colegas de turma **Wanderson e Moises**, não só pela boa convivência ao longo de aproximadamente, esses 24 (vinte e quatro) meses de curso, já que foram estes bravos amigos, que tanto se dedicaram em ajudar aos demais, nos estudos em termodinâmica e da disciplina ‘temível’ - fundamentos matemáticos - que tanto custou horas de sono para ser aprovado nela, o meu profundo agradecimento! E, todos os demais pela curta, mas intensa convivência com todos!

Agradecer o pessoal do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp/CBiotec/UFPB) – Hellen, Nattanael, Gabriel, Emmely, Lucas que nos auxiliaram no desenvolvimento da parte experimental, crucial para a finalização do trabalho de dissertação.

Agradecer aos docentes: **Profa. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa** (DBCM/CBiotec/UFPB) que tanto contribuiu com o nosso trabalho final dando-nos preciosas dicas de como melhorá-lo, a qual esteve compondo com muita honra, a banca avaliadora da apresentação do projeto, bem no início de tudo, assim como na pré-banca e agora novamente na banca do trabalho final, muito obrigado professora por ter sempre aceitado nos brindar com a sua participação! **Profa. Dra. Cristiani Viegas Brandão Grisi** (Pós-Doc/PPGEQ/UFPB) e **Profa. Dra. Flávia de Oliveira Paulino** (DBCT/CBiotec/UFPB) por terem aceito o convite de comporem essa banca avaliadora, o que para nós é uma honra, e só abrilhantam este ato conclusivo.

OBRIGADO!

RESUMO

A utilização do extrato aquoso da algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw) DC) como substrato para processos biotecnológicos torna-se uma estratégia interessante, pois tem composição rica em carboidratos e proteínas. As enzimas pectinolíticas são exemplos de enzimas que podem ser sintetizadas por fungos filamentosos e têm diversas aplicações industriais. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de utilização do extrato aquoso da algaroba como substrato para produção de enzimas pectinolíticas a partir de fungos filamentosos. Para produção enzimática foram utilizados os isolados fúngicos, *Paecilomyces* sp. TP08, *Aspergillus* sp. NA01 e *Penicillium* sp., cultivados em extrato aquoso da algaroba a 1% (v/v) com pH ajustado a 5,8. Para os cultivos, foi adicionada uma alíquota de 10% (v/v) de uma suspensão de conídios a 1×10^7 conídios/mL em cada um dos frascos de cultivo a um volume final de meio de 100 mL. Amostras foram retiradas a cada 24 h para verificação da atividade enzimática para cada um dos isolados fúngicos. O cultivo foi acompanhado pela determinação do crescimento microbiano (método da biomassa seca), pela determinação do consumo de substrato (método DNS) e, pela atividade enzimática utilizando como substrato específico a pectina cítrica a 0,5% (p/v) em tampão acetato (pH 5,5). O extrato aquoso da algaroba (lote 2018 e lote 2023) foi caracterizado quanto à quantidade de sólidos solúveis totais, de açúcares redutores totais e de pectina para verificação do potencial de utilização como substrato na produção de enzimas microbianas. Assim, o extrato de algaroba (lote 2018) apresentou conteúdo de sólidos solúveis totais igual a 28 °Brix e açúcar redutor total igual a 210g/L e para o extrato de algaroba (lote 2023) foi determinado 19°Brix e 180g/L de açúcares redutores totais. Portanto, considerado fonte significativa de açúcares para o desenvolvimento de microrganismos em processos biotecnológicos. A quantidade de pectina na forma de pectato de cálcio encontrado neste trabalho foi de 0,262 e 0,784, respectivamente, para os extratos de algaroba a 10% (lote 2018) e 1% (lote 2023). O suco de maçã apresentou SST de 16,1 °Brix e o suco de caju 6,0 °Brix. Em relação à produção de pectinases, os resultados indicam que *Aspergillus* sp. NA01, no quarto dia, apresentou uma produção de 2,460 U/mL. Assim como o rápido consumo dos açúcares, apresentando melhores resultados em relação à produção de pectinases, seguido do *Penicillium* sp. e do *Paecilomyces* sp. TP08, respectivamente. Houve redução nos valores de absorbância em 440 nm e 520 nm para os sucos tratados em relação ao controle. Essa clarificação foi calculada em 0,26% e 0,21% para os sucos de maçã e caju, respectivamente. Portanto, os resultados obtidos foram comparados entre as espécies fúngicas, dando destaque para a espécie fúngica *Aspergillus* NA01 sp. demonstrando que a produção de enzimas pectinolíticas a partir do extrato aquoso da algaroba representa uma abordagem promissora na indústria biotecnológica. Os resultados mostram que o complexo enzimático produzido pelo isolado *Aspergillus* sp NA01, em extrato aquoso de algaroba, pode atuar como agente clarificante em sucos de fruta, como caju e maçã.

Palavras-chave: enzimas fúngicas; *Paecilomyces* sp.; *Aspergillus* sp.; *Penicillium* sp.; substratos de baixo custo; isolados fúngicos.

ABSTRACT

The use of the aqueous extract of mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC) as a substrate for biotechnological processes becomes an interesting strategy, as it has a composition rich in carbohydrates and proteins. Pectinolytic enzymes are examples of enzymes that can be synthesized by filamentous fungi and have several industrial applications. Thus, the present study aimed to evaluate the potential for using mesquite aqueous extract as a substrate for the production of pectinolytic enzymes from filamentous fungi. For enzyme production, the fungal isolates *Paecilomyces* sp. TP08, *Aspergillus* sp. NA01, and *Penicillium* sp., cultivated in 1% (v/v) mesquite aqueous extract with pH adjusted to 5.8. For cultures, an aliquot of 10% (v/v) of a conidial suspension at 1×10^7 conidia/mL was added to each of the culture flasks to a final medium volume of 100 mL. Samples were taken every 24 h to check enzymatic activity with the fungal isolates. The cultivation was monitored by the determination of microbial growth, dry biomass method, by the determination of substrate consumption, DNS method and by enzymatic activity using 0.5% (w/v) citrus pectin in acetate buffer as a specific substrate (pH 5.5). The aqueous extract of mesquite (lot 2018) presented an amount of TSS equal to 28 °Brix, which means that the solution has enough fermentable carbohydrates to be used as a substrate in transformation processes through microbial action. The determination of the ART of 210 g/L of complex sugars proves the amount of sugars present in the sample in terms of glucose. In the same sense, the TSS and ART content in the aqueous extract (lot 2023) was determined, 19 °Brix and 180 g/L, respectively, considered a significant source of sugars for the development of microorganisms in biotechnological processes. The amount of pectin in the form of calcium pectate found in this work was 0.262 and 0.784, for mesquite extracts at 10% and 1%, respectively. Apple juice had an SST of 16.1 °Brix and cashew juice 6.0 °Brix. Regarding the production of pectinases, the results indicate that *Aspergillus* sp. NA01, on the fourth day, presented a production of 2,460 U/mL. As well as the rapid consumption of sugars, showing better results in relation to the production of pectinases, followed by *Penicillium* sp. and *Paecilomyces* sp. TP08, respectively. There was a reduction in absorbance values at 440 nm and 520 nm for the treated juices in relation to the control. This clarification was calculated at 0.26% and 0.21% for apple and cashew juices, respectively. Therefore, the results obtained were compared between fungal species, highlighting the fungal species *Aspergillus* NA01 sp. demonstrating that the production of pectinolytic enzymes from mesquite aqueous extract represents a promising approach in the biotechnology industry. The results show that the enzyme complex produced by the isolate *Aspergillus* sp. NA01, in aqueous mesquite extract, can act as a clarifying agent in fruit juices, such as cashew and apple.

Keywords: fungal enzymes; *Paecilomyces* sp.; *Aspergillus* sp.; *Penicillium* sp.; low-cost substrates; fungal isolates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1– Distribuição mundial da <i>P. juliflora</i>	15
Figura 3.2 –Algarobeira	16
Figura 3.3– Madeira da algaroba.	19
Figura 3.4– Vagem da algaroba.	21
Figura 3.5-Sementes da algaroba.	22
Figura 3.6 - Estrutura da molécula de pectina, exibindo a estrutura do ácido galacturônico parcialmente metilesterificado.	26
Figura 3.7 - (a) Estrutura da pectina (b) Estrutura da pectina no modelo tradicional exibindo o homogalacturonan (HG) como espinha dorsal, região lisa e resíduo de 60 açúcares.	27
Figura 3.8- Estrutura da parede celular vegetal contendo as moléculas de pectina	28
Figura 3.9 – Tipos principais de pectinases	31
Figura 3.10 - Conidióforos, fiálides, conídios e clamidósporos terminais de <i>P. varios</i>	35
Figura 3.11- Corpo de frutificação do <i>Penicillium</i> sp.	37
Figura 3.12 -Morfologia do <i>Aspergillus</i> sp.	40
Figura 3.13 - Etapas do processo para conversão de substrato de baixo custo em diversas enzimas por cepas de <i>Aspergillus</i>	41
Figura 4.1 -Fluxograma experimental	44
Figura 5.1 – Aspecto macroscópico da biomassa seca de <i>Aspergillus</i> sp. NA01(A) e <i>Paecilomyces</i> sp. TP08(B)	54
Figura 5.2 – Produção de pectinases utilizando o isolado <i>Penicillium</i> sp.	56
Figura 5.3- Produção de pectinases utilizando o isolado <i>Paecilomyces</i> sp. TP08.	58
Figura 5.4- Produção de pectinases utilizando o isolado <i>Aspergillus</i> NA01 sp.	59
Figura 5.5- Produção de pectinases, em comparação, nos ensaios com <i>Penicillium</i> sp., <i>Paecilomyces</i> sp. TP080e <i>Aspergillus</i> sp. NA01	61
Figura 5.6 – Acompanhamento cinético do crescimento do <i>Aspergillus</i> sp. NA01 em meio a 1% de extrato aquoso da algaroba (<i>P. juliflora</i>)	63
Figura 5.7– Produção de pectinases e proteínas por <i>Aspergillus</i> sp. NA01 em meio a 1% de extrato aquoso da algaroba (<i>P. juliflora</i>)	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Classificação taxonômica da <i>Prosopis juliflora</i>	17
Tabela 3.2 - Composição físico-química da farinha da vagem de algaroba.....	18
Tabela 3.3- Principais características dos diferentes fitoquímicos identificados em diferentes partes da <i>Prosopis juliflora</i>	19
Tabela 3. 4 - Diferentes tipos de substâncias pécicas	30
Tabela 3. 5 - Classificação taxonômica do <i>Paecilomyces</i> sp.	36
Tabela 5. 1 – Caracterização físico-química dos meios de cultivos e de clarificação	52
Tabela 5.2– Clarificação de suco de fruta por meio da ação do caldo enzimático pectinolítico	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1 ALGAROBA.....	15
3.1.1 Características físico-químicas e aplicações tecnológicas da algaroba	17
3.2. SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	23
3.3 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS E PECTINASES	25
3.3.1. Substâncias pécticas	25
3.3.2. Enzimas pectinolíticas.....	30
3.3.2.1. Poligalacturonases – PG.....	32
3.3.2.2. Pectina liase – PL	34
3.3.2.3. Pectinesterase – PE.....	34
3.3.3. Fungos filamentosos usados na produção de enzimas pectinolíticas.....	35
3.3.3.1 Paecilomyces sp.	35
3.3.3.2. Penicillium sp.	37
3.3.3.3. Aspergillus sp.	39
3.3.4. Aplicações de enzimas pectinolíticas	42
4. METODOLOGIA	44
4.1. FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL	44
4.2 SUBSTRATO.....	45
4.2.1 Caracterização do substrato.....	45
4.2.1.1 Teor de sólidos solúveis totais (SST).....	45
4.2.1.2 Determinação de açúcares redutores totais (ART).....	45
4.2.1.3 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH).....	46
4.2.1.4 Determinação do teor de pectina.....	46
4.3 MICRORGANISMOS	47
4.4 PREPARO DO INÓCULO	48
4.5 CULTIVOS PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	48
4.5.1 Análises do processo de produção enzimática	49
4.5.1.1 Determinação da concentração de biomassa microbiana.....	49

4.5.1.2 Determinação da concentração de substrato	49
4.5.1.3 Determinação da atividade de pectinases.....	49
4.6 APLICAÇÃO DO CALDO ENZIMÁTICO.....	50
4.6.1 Preparo as amostras para o processo de clarificação dos sucos de fruta.....	50
4.6.2 Determinação da clarificação dos sucos de fruta	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS.....	52
5.2 PROCESSO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	54
5.2.1 Cultivos para verificação da habilidade dos isolados fúngicos em produzir	54
5.2.2 Produção de pectinases por Aspergillus NA01 sp.	62
5.2.3. Aplicação das pectinases fúngicas de Aspergillus NA01 sp. no processo de clarificação de sucos	64
6. CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

A algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw) DC) é uma árvore amplamente distribuída no Brasil e em outros países, sendo considerada uma espécie invasora em algumas regiões. A mesma adaptou-se facilmente ao clima semiárido do Nordeste brasileiro, em que se pode destacar como seus principais usos o reflorestamento de matas e o uso da madeira na indústria de móveis. Já as vagens são importante fonte de carboidratos (75,22%) e proteínas (13% de proteína bruta) (BORGES, 2004; SILVA *et al.*, 2007). A polpa doce das vagens e as sementes concentram cerca de 34-39 % de proteínas e 7-8 % de óleos. Na alimentação humana, a algaroba é utilizada na fabricação de farinhas e melados, em substituição a alguns alimentos convencionais como farinha de trigo, café e rapadura (RIBASKI *et al.*, 2009).

As vagens da algaroba, devido sua composição rica em nutrientes, podem ser utilizadas como fonte de substrato para o crescimento de microrganismos de interesse industrial. O extrato aquoso da algaroba., como substrato para processos biotecnológicos, este sendo uma alternativa interessante, pois poucos são os relatos na literatura nacional (MUNIZ, 2009; PEDREIRA *et al.*, 2022) e internacional (NJOKWENI *et al.*, 2019; SALEH, ABU-DIEYEH, 2021; MK *et al.*, 2023) da sua utilização para obtenção de bioprodutos. Embora, alguns dos seus resíduos, como cascas e sementes, venham sendo explorados para a produção enzimática.

Estudos anteriores destacaram o potencial da utilização do bagaço obtido da extração aquosa de suas vagens e/ou o seu próprio extrato aquoso como substrato para a produção de enzimas pectinolíticas por meio de processos fermentativos devido à composição rica em sacarose, glicose, algumas proteínas e ainda pectinas existentes na vagem da algaroba (VIJAYARAGHAVAN *et al.*, 2016; SHARMA, 2016).

As enzimas têm diversas aplicações industriais e são amplamente utilizadas (ANDRADE *et al.*, 2018). Em particular, as pectinolíticas são utilizadas nas indústrias vinícolas e de sucos de frutas, o que resulta na redução da viscosidade dos sucos, dentre outros parâmetros (UENOJO e PASTORE, 2007). Já as proteases são utilizadas na indústria farmacêutica, no processamento de alimentos, na produção de extratos de leveduras, e em bebidas (como cervejas resistentes ao congelamento), por exemplo (SINGH *et al.*, 2016; TAVANO *et al.*, 2018).

Numerosos fungos e leveduras filamentosos, incluindo *Aspergillus niger* (EL ENSHASY *et al.*, 2018), *Aspergillus oryzae* (KETIPALLY *et al.*, 2018), *Aspergillus awamori* (PRAVEEN, 2020), *Aspergillus sojae* (MANGRIO *et al.*, 2023), *Trichoderma viridiae* (YASIN

et al., 2022), *T. virens* (SILVA *et al.*, 2022), *Penicillium* sp. (AHMED e RAHMAN, 2021) e *Paecilomyces* sp. (ANDRADE *et al.*, 2023), têm a capacidade de fabricar pectinase.

Para explorar esse potencial, o presente estudo teve como hipótese que o extrato de algaroba pode ser utilizado como substrato para a produção de enzimas pectinolíticas usando os fungos filamentosos. Nesse sentido, foram utilizados isolados fúngicos como *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp. TP08 e *Aspergillus* sp., para verificar suas habilidades de produzir enzimas microbianas induzidos para composição do extrato aquoso das vagens de algaroba.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de enzimas pectinolíticas a partir do extrato aquoso da algaroba usando os fungos filamentosos *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp. TP08 e *Aspergillus* sp. NA01.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

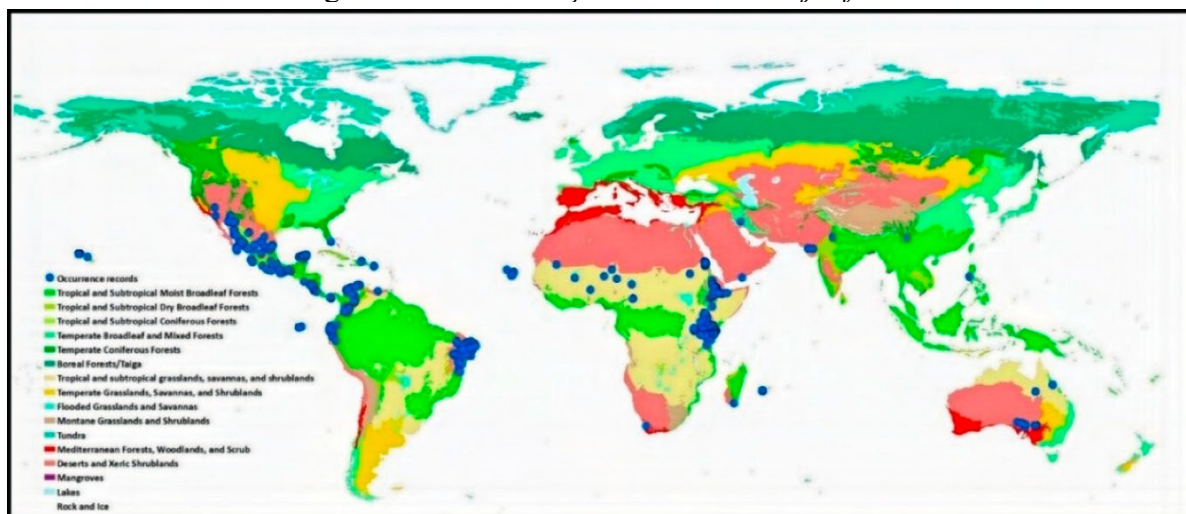
- Verificar dentre os isolados estudados qual terá maior habilidade de produção de pectinases nas condições de processo utilizadas.
- Verificar o potencial de utilização do extrato aquoso de algaroba na produção de pectinases;
- Determinar as atividades de pectinases;
- Verificar a potencial aplicação do caldo enzimático produzido em processo de clarificação de suco de frutas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ALGAROBA

O gênero *Prosopis* L. compreende 44 espécies de árvores e arbustos de médio porte, nativos da África, Ásia, América do Norte e do Sul (Figura 1). Estas espécies são membros da família Fabaceae, subfamília Mimosoideae. *Prosopis* é um gênero que pode ser encontrada em 129 países do mundo, principalmente em climas quentes, secos e semiáridos. Das 44 espécies do gênero *Prosopis* L., pelo menos 19 são conhecidas por serem danosas às suas áreas de distribuição, sendo as outras espécies benéficas (DAKHIL *et al.*, 2021). Possui crescimento rápido (5–10 m), sendo considerada uma árvore tropical nativa de áreas livres de geadas do Peru, América Central e Caribe (Figura 3.1).

Figura 3.1– Distribuição mundial da *P. juliflora*



Fonte: Dakhil *et al.* (2021)

Em seus locais de origem, também é utilizado como alimento para humanos e animais devido à sua alta produtividade de vagens e excelentes qualidades nutricionais (MENDES, 1988). As vagens de *P. juliflora*, ou seu farelo, são amplamente utilizadas na alimentação de bovinos leiteiros e de corte, com bons resultados nutricionais e econômicos devido à sua palatabilidade e conteúdo nutricional (RUÍZ-NETO *et al.*, 2020; RAM *et al.*, 2022; ALMEIDA *et al.*, 2022).

Além disso, a árvore (Figura 3.2) é capaz de fixar nitrogênio graças aos seus extensos sistemas de raízes principais laterais rasas e profundas *Prosopis juliflora*, *Prosopis glandulosa*,

Prosopis velutina e seus híbridos na África do Sul e na Austrália estão entre as espécies invasoras mais conhecidas do gênero (DAKHIL *et al.*, 2021).

Figura 3.2 –Algarobeira



Fonte: Ribaski *et al.* (2009).

A dispersão natural do gênero no Brasil está centrada no extremo sul de Mato Grosso do Sul, onde ocorre *P. rubriflora* E. Hassler, no sudoeste do Rio Grande do Sul, onde são encontradas *P. affinis* e *P. nigra*, e em uma pequena área entre os estados de Pernambuco e Piauí, onde é encontrada *P. ruscifolia* (SILVA, 1988). Allem e Valls (1987) indicam a presença de *P. algarobila*, *P. rubriflora*, *P. ruscifolia* e *P. fiebrigii* Harms como forrageiras nativas no Pantanal mato-grossense, ampliando ainda mais a dispersão natural de espécies de *Prosopis* no Brasil. *Prosopis juliflora* é a espécie encontrada tanto em populações subespontâneas quanto cultivadas no Nordeste do Brasil.

A única espécie de algaroba cultivada na região Nordeste do Brasil é *Prosopis juliflora*. Os plantios são feitos em sistemas puros ou consorciados com o objetivo principal de gerar ração e lenha. Existe uma estimativa de mais de 500 mil hectares; no entanto, nem a superfície das árvores de algaroba plantadas e/ou regeneradas nem o potencial dos locais onde se encontram são inventariadas (Silva *et al.*, 2007). A Tabela 3.1 traz a classificação taxonômica da algaroba:

Tabela 3.1 - Classificação taxonômica da *Prosopis juliflora*.

Classificação taxonômica	
Reino	<i>Plantae</i>
Sub – reino	<i>Viridiplantae</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordem	<i>Fabales</i>
Família	<i>Fabaceae</i>
Gênero	<i>Prosopis</i>
Espécie	<i>Prosopis juliflora</i>

Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2007).

Segundo a taxonomia, *P. juliflora* pertence à família Fabaceae, que representa um dos maiores grupos de angiospermas. Sua principal característica é a presença de frutos em forma de vagem, embora haja algumas exceções. A família Fabaceae inclui espécies arbóreas e herbáceas anuais, muitas das quais são altamente valiosas para alimentação e comércio (feijão, soja, etc.) (YANDA *et al.*, 2022). Além disso, está classificada na classe das magnoliopsidas, que se trata de uma classe de plantas vasculares que produzem flores e sementes (MATTA, NANDA e MAHALINGAM, 2017).

3.1.1 Características físico-químicas e aplicações tecnológicas da algaroba

A algaroba apresenta uma relevância significativa devido às suas diversas utilidades. Segundo Silva *et al.* (2015), essa espécie é tradicionalmente utilizada na alimentação animal, na produção de lenha, carvão vegetal, madeira e na medicina popular. Além disso, possui compostos bioativos, como taninos, flavonoides e alcaloides, com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias. Os produtos desta planta também têm sido utilizados na fabricação de pães (BIGNE, PUPPO e FERRERO, 2018; KORUS *et al.*, 2022), biscoitos (FABIANI *et al.*, 2020), doces (ALEMÁN-HUERTA *et al.*, 2023), xaropes (GONZALES-BARRON *et al.*, 2020) e bebidas alcoólicas destinadas ao consumo humano (VAN DEN EYNDEN *et al.*, 2003).

A algaroba também tem aplicações em processos de produção de aguardente e de bioetanol a partir das suas vagens, que possuem elevadas concentrações de açúcares tornando potencial substrato em processos biotecnológicos (ALVES, SANTOS e SILVA, 2019). Além disto, existem pesquisas voltadas para produção de biossurfactantes (DIAS, 2017; 2018). Portanto, devido às suas propriedades físico-químicas, tem despertado interesse em várias áreas, incluindo a produção de enzimas. Estudos têm sido realizados para investigar o potencial

da algaroba na produção de enzimas pectinolíticas e proteolíticas, utilizando suas sementes e parte vegetativas (folhas, madeira, raízes) como substrato (KAPOOR *et al.*, 2008). Além disso, a algaroba tem sido objeto de estudos como uma possível fonte de biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis (ELLSWORTH *et al.*, 2018).

Estudos e pesquisas têm sido conduzidos para explorar suas propriedades e aplicações, visando ao aproveitamento sustentável dessa espécie e ao desenvolvimento de aplicações econômicas e ambientalmente benéficas (SILVA *et al.*, 2015). A Tabela 3.2 apresenta as propriedades físico-químicas extraídos a partir da farinha da vagem de algaroba, o que torna possível, por exemplo para o desenvolvimento de enzimas pectinolíticas e proteolíticas, devido seu considerável teor de açúcares totais e redutores conforme estudos realizados anteriormente por Figueredo (1990) e Silva *et al.* (2007).

Tabela 3.1 - Composição físico-química da farinha da vagem de algaroba.

Parâmetros	g.100 g⁻¹
Umidade	5,8 ± 0,9
Açúcares totais	56,5 ± 0,4
Açúcares redutores	4,6 ± 0,3
Fibra alimentar total	7,2 ± 0,5
Proteínas	9,0 ± 1,5
Cinzas	3,6 ± 0,1
Lipídeos	2,1 ± 1,3
Tanino	0,3 ± 0,0

Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2007)

A madeira (Figura 3.3) de *P. juliflora* é composta de 11-28% de lignina, 25-30% de hemicelulose e 40-45% de celulose (DAVE e BHANDARI, 2013). De acordo com Ibrahim *et al.* (2013), as folhas secas da planta podem conter até 3,6% de flavonoides. Os alcaloides também estão presentes em grande quantidade (2,2%) nas folhas. Muitos desses alcaloides - incluindo juliflorina, julifloricina, julifloridina, juliprosineno, juliprosina, juliprosopina e mesquitol - eram até então desconhecidos e receberam nomes em homenagem a *P. juliflora* (DAMASCENO *et al.*, 2017).

Figura 3.1– Madeira da algaroba.



Fonte: Projeto verde (2015).

Existem numerosos fitoquímicos com qualidades medicinais encontrados em *P. juliflora*. Diferentes componentes fenólicos, como taninos, ácidos, glicosídeos, flavonóides e alcalóides, incluindo alcalóides piperidínicos, foram encontrados em extratos de folhas selecionados em estudos anteriores (SATHIYA e MUTHUCHELIAN, 2008; RAGHAVENDRA *et al.*, 2009). Os fitoquímicos primários encontrados nas espécies *P. juliflora* estão resumidos na Tabela 3.3:

Tabela 2.3 - Principais características dos diferentes fitoquímicos identificados em diferentes partes (folhas, vagens e sementes) da *Prosopis juliflora*.

Nome	Massa molecular	Tipo	Característica
4'-Metilepigallocatequina	320,29	Catequina	$C_{16}H_{16}O_7$
Mesquitol	290,26	Flavonóide	$C_{15}H_{14}O_6$
Apigenina-6,8-di-Cglicosídeo	594,50		$C_{27}H_{30}O_{15}$ igual à Vicenina 2
Criseoeriol 7-Oglucosídeo	462,40		$C_{22}H_{22}O_{11}$
Luteolina 7-Oglucosídeo	448,40	Glicosiloxi-flavona	$C_{21}H_{20}O_{11}$ Conhecido como Cynaroside
Kaempferol 3-Ometil éter	300,26	Apigenina	$C_{16}H_{12}O_6$ Conhecido como Isokaempferide
Quercitina 3-Ometil éter	316,26	Flavonóide	$C_{16}H_{12}O_7$
Isorhamnetina-3-Oglucosídeo	478,40		$C_{22}H_{22}O_{12}$
Isorhamnetina-3-orutinosídeo	624,50		Conhecido como Narcissina $C_{28}H_{32}O_{16}$
Quercitina 3-orutinosídeo	610,50		Conhecido como Rutina $C_{27}H_{30}O_{16}$

Nome	Massa molecular	Tipo	Característica
Quercetina-3glicosídeo	463,40	Flavonóide	Conhecido como isoquercetina C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂
Julifloridina	299,50	Alcalóide	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂
N-metil julifloridina	313,75	Alcalóide	C ₁₉ H ₃₉ NO ₂
Prosafrinina	297,50	Alcalóide	C ₁₈ H ₃₆ NO ₂
Prosopina	287,44	Alcaloide	C ₁₆ H ₃₃ NO ₂
3''-Oxojuliprosopina	644,56	Alcalóide	C ₄₀ H ₇₄ N ₃ O ₃
3-Oxo-juliprosina	625,55	Alcalóide	C ₄₀ H ₇₁ N ₃ O ₂
Juliprosinina	626,55	Alcaloide	C ₄₀ H ₇₂ N ₃ O ₂
Prosoflorina	627,32	Alcalóide	C ₄₀ H ₇₃ N ₃ O ₂
Juliprosina	628,55	Alcalóide	C ₄₀ H ₇₂ N ₃ O ₂
Juliprosopina	630,59	Alcalóide	C ₄₀ H ₇₆ N ₃ O ₂
Julifloricina	630,00	Alcalóide	Conhecido como juliflor ine C ₄₀ H ₇₅ N ₃ O ₂
Secojuliprosopinal	576,90	Alcalóide	C ₃₆ H ₆₈ N ₂ O ₃
Juliprosineno	646,40	Alcalóide	C ₃₉ H ₆₈ N ₃ O ₂
Patuletina	332,26	Alcalóide	C ₁₆ H ₁₂ O ₈
Zerumbone	218,33	Alcalóide	C ₁₅ H ₂₂ O
5,7,8-Trihidroxí3-metoxiflavona	300,26	Alcalóide	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
Schaftoside	564,50	Alcalóide	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄
Indolizidina	124,21	Alcalóide	C ₈ H ₁₅ N
Fenetilamina	121,18	Alcalóide	C ₈ H ₁₁ N
Catequina	290,26	Flavonóide	C ₁₅ H ₁₄ O ₆
Myo-Inositol, 4-Cmetil	194,18		Conhecido como Laminitol C ₇ H ₁₄ O ₆
Ácido desidroabiético	300,40		C ₂₀ H ₂₈ O ₂
Ácido linoléico	280,44	Ácido graxo	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
Triptamina	160,20	Alcalóide	C ₁₀ H ₁₂ N ₂
luteolina	286,23	Flavonóide	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Quercetina 3-Ometil éter	316,26	Flavonóide	C ₁₆ H ₁₂ O ₇
Piperidina	85,15	Amina	C ₅ H ₁₁ N
Siringina	372,40	Monossacárido	C ₁₇ H ₂₄ O ₉
Lariciresinol	360,40	Ligan	C ₂₀ H ₂₄ O ₆
Triptofano	204,23	Aminoácido	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂

Fonte: Adaptado de Saleh (2022)

Segundo Silva *et al.* (2018) e Damasceno *et al.* (2018), os alcaloides piperidínicos primários que foram purificados das diversas partes de *P. juliflora*. Estes incluem julifloridina, N-metil julifloridina, juliprosopina (juliflorina), julifloricina, juliprosina, 3'-oxo-juliprosopina, secojuliprosopinal, 3-oxojuliprosina, juliprosineno e mesquitol. Um grande número desses aleloquímicos se dissolve na água. Os extratos de *P. juliflora* mostraram a presença de polissacarídeos como arabinose e compostos contendo glicose e galactomananas (com proporções variadas de galactose e manose) além de compostos fenólicos (SILVA *et al.*, 2018; DAMASCENO *et al.*, 2018).

No tocante a composição química das vagens (Figura 3.4), são uma rica fonte de carboidratos e proteínas, com um valor energético bruto comparável ao do milho (SILVA *et al.*, 2003; STEIN *et al.*, 2005). Consistem em 58% de pericarpo, 23,1% de casca de semente e 13,9% de sementes (DELL VALLE *et al.*, 1983). Além disso, sabe-se que 100g de vagens de algaroba fornecem 333 calorias, 13g de água, 16g de proteínas, 3,2g de gorduras, 65,8g de carboidratos, 10,8g de fibras brutas, 3,3g de cinzas, 450mg de cálcio, 627mg de fósforo, 6,6mg de ferro, além de 0,33mg de vitamina B1 e 2,6mg de vitamina B6 (CAMPELO, 1989 apud DANTAS, 2022).

Figura 3.2 - Vagem da algaroba.



Fonte: Hughes *et al.* (2022)

Geralmente, o farelo de algaroba é obtido através da secagem das vagens em temperaturas entre 60 e 80°C, seguida de moagem (SILVA *et al.*, 2002). Além disso, a parede das sementes da algarobeira (Figura 3.5) contém sacarose e outras substâncias que, se transformadas em farinha, podem ser utilizadas na alimentação humana.

Figura 3.3 - Sementes da algaroba.



Fonte: Projeto verde (2015).

De acordo com a análise físico-químicas a partir da farinha da semente, Silva *et al.* (2007) verificou que a concentração de açúcares totais foi de 56,5 g por 100 g de farinha. Essa quantidade, quando combinada com a concentração de fibras encontrada, totalizou 63,7 g.100.g⁻¹. Esses resultados divergem dos obtidos pela avaliação físico-química realizada por Figueiredo (1990), que determinou um teor de carboidratos de 75,22% na vagem de algaroba. Essa discrepância pode ser atribuída a fatores como as diferentes condições de cultivo e solo.

Esses resultados confirmam que os açúcares são a principal fonte de nutrientes nesse produto. Em relação aos tipos de açúcares presentes, foi observada uma predominância acentuada de sacarose e uma presença discreta de glicose, como relatado por Silva *et al.* (2001) e Figueiredo (2009), que detectaram concentrações de 46% e 29% de sacarose, respectivamente.

O teor de proteínas encontrado por Jardim *et al.*, (2022) na farinha de algaroba foi de 8,85%, próximo ao valor já reportado na literatura de 9%, por Silva *et al.* (2007). Esse valor é inferior ao detectado por Holmquist-Donquis e Rey (1997), que encontraram 14,56% de proteínas na vagem inteira de algaroba, e superior ao valor obtido por Figueiredo (2009), que identificou 5,58% de proteínas. Silva *et al.* (2002) constataram que a vagem de algaroba possui um teor de proteína semelhante ao do milho (que varia de 7,43% a 10,9%), porém apresenta um valor mais elevado de fibras, com 31% de fibra insolúvel ligada a 0,33% de tanino condensado e 1,6% de fibra solúvel ligada a 0,88% de tanino solúvel estão presentes na polpa da vagem, que representa 56% do fruto. Esses autores também relataram que a polpa da vagem,

correspondente a 56% do fruto, contém 1,6% de fibra solúvel associada a 0,88% de tanino solúvel e 0,33g.100g⁻¹ de tanino condensado, além de 31% de fibra insolúvel associada a.

Esses compostos possuem a capacidade de reter uma grande quantidade de água, aumentando consideravelmente de volume e formando soluções altamente viscosas (FIGUEIREDO, 1990). Em outros estudos, foi constatado um teor de lipídios de 2,1 g por 100 g, o que é considerado baixo em comparação com outras leguminosas, como a soja (apresenta 15-25% de lipídios totais). Essa quantidade é inferior à relatada por Holmquist-Donquis e Rey (1996) em sua pesquisa. Além disso, de acordo com Silva *et al.* (2007), foi observada uma quantidade de 3,2 g de lipídios por 100 g na vagem de algaroba, enquanto Figueiredo (2007) detectou uma quantidade de 4,89 g de lipídios por 100 g. Diante do exposto, pode-se constatar que a algaroba possui uma ampla variedades de substâncias presentes nas folhas, caule, sementes e vagens que a possibilita diversas aplicações de interesse comercial, considera-se a sua utilização para produção de carvão vegetal, suplementação na ração animal e como substrato em processos biotecnológicos, dentre esses processos está sua potencial aplicação na produção de enzimas microbianas.

3.2. SUBSTRATOS DE BAIXO CUSTO PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

As enzimas são amplamente utilizadas em diversos setores industriais, como: alimentos, cosméticos, têxteis, medicamentos e diagnósticos. De acordo com estimativas, o mercado para estas enzimas aumentará a uma taxa composta de crescimento anual de 7,1% de 2020 a 2027 (LEITE *et al.*, 2021; MENEZES *et al.*, 2022). Assim, a produção de enzimas microbianas tem ganhado destaque na indústria devido à sua ampla aplicabilidade em diversos processos, mesmo que sua obtenção seja onerosa, devido aos insumos e substratos utilizados (RAMESH *et al.*, 2020).

Nesse cenário, substratos considerados de baixo custo ganham relevância como alternativas viáveis na produção enzimática, em que uma estratégia promissora é a agregação de valor à resíduos de processamento agroindustriais, ou subprodutos da cadeia produtiva biotecnológica ou, ainda, substâncias renováveis com alta concentração de açúcares fermentescíveis, que podem ser utilizadas como substratos para produção de enzimas de interesse industrial (KIRAN *et al.*, 2014).

Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de explorar esses substratos de baixo custo como fontes promissoras de nutrientes para o crescimento microbiano e síntese de enzimas. O uso desses substratos não apenas contribui para a redução de custos, mas também

representa uma abordagem sustentável, pois aproveita resíduos ou subprodutos que, de outra forma, seriam descartados no meio ambiente (MUSSATO *et al.*, 2012; MADEIRA JR *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2022). Alguns estudos podem ser citados a fim de demonstrar que as pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de encontrar estratégias de processos sustentáveis ambientalmente, seja utilizando cultivos em estado sólido ou submerso.

No estudo de Shrestha *et al.* (2022), ao produzir a mistura de resíduos agrícolas de casca de laranja, casca de romã e polpa e sementes de abóbora, mostrou que a *Streptomyces* sp. foi capaz de sintetizar diversas enzimas, sendo um forte concorrente para vários processos de biodegradação de resíduos agrícolas de baixo custo, em que a combinação de resíduos agrícolas melhorou a síntese de enzimas em oposição ao uso de uma única matéria-prima.

Sharma, Sharma e Mahajan (2019), por sua vez, descrevem o uso de uma estratégia para produção simultânea aumentada de enzimas alcalinas xilanase-pectinase por um isolado bacteriano em curto ciclo de fermentação submersa, adicionando a xilana extraída bruta e pectina como substratos, 2% de farelo de trigo e 2% de casca de frutas cítricas. Sethi *et al.* (2016), também utilizou substratos naturais para a biossíntese de pectinase de *A. terreus* NCFT4269, que incluíram bolo de óleo de nim, bolo de óleo de mostarda, bolo de óleo de amendoim, cascas de grama verde, cascas de grama preta, cascas de ervilhaca, resíduos de milho, arroz quebrado, farelo de trigo, milho resíduos, bagaço de maçã, cascas de banana e cascas de laranja.

Pode-se, ainda, enfatizar o uso da casca de fruta como matéria-prima de baixo custo para produção de enzimas, como mencionado pelos estudos supracitados. A casca de banana, por exemplo, tem sido investigada como fonte de pectinases, amilases e celulases. Estudos demonstraram que o extrato aquoso de cascas de banana proporcionou um ambiente propício para a produção dessas enzimas por fungos filamentosos, como *Aspergillus niger* (LIU *et al.*, 2017).

No entanto, quando investigou dois substratos, a casca de laranja e a polpa de beterraba, Almowallad *et al.* (2022), afirmaram que a polpa de beterraba foi a fonte de carbono mais preferida em relação à casca de laranja e, quando comparado à polpa de beterraba sacarina, o meio que incluía casca de laranja como única fonte de carbono produziu o teor máximo de proteína para todas os fungos testados em culturas agitadas e estáticas. Em relação aos fungos, *A. niger* AUMC 4156 mostrou-se mais promissor como produtor de endo-PG, mas *P. oxalicum* AUMC 4153 produziu mais endo-PG quando as condições foram perturbadas.

Outro subproduto de baixo custo bastante estudado é o bagaço de cana-de-açúcar. Esse resíduo é rico em celulose e hemicelulose, tornando-o uma excelente fonte de nutrientes para

microrganismos produtores de enzimas celulolíticas. A produção de celulasas e xilanases a partir do bagaço de cana-de-açúcar por fungos do gênero *Trichoderma*, já foi relatada (MOHARRAM, ZOHRI e HUSSEIN, 2021).

Foi reportada a utilização de subprodutos da indústria de alimentos, como a torta de girassol. A torta de girassol é rica em proteínas e lipídios, o que a torna uma excelente opção para a produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas. Pesquisas têm demonstrado a produção dessas enzimas por fungos do gênero *Aspergillus* a partir da torta de girassol (BILAL *et al.*, 2020; SOUSA *et al.*, 2022).

É importante destacar que a escolha do substrato de baixo custo adequado depende das características específicas do microrganismo produtor de enzimas e da enzima desejada. Portanto, estudos de otimização do processo e ajustes nas condições de fermentação são fundamentais para maximizar a produção enzimática a partir desses substratos. O aproveitamento de resíduos agroindustriais como fontes de nutrientes representa não apenas uma abordagem econômica, mas também uma forma de agregar valor à subprodutos, transformando-os em produtos de alto valor produtivo, com potencial aplicação em diversas indústrias. A contínua pesquisa nessa área pode proporcionar novas oportunidades e avanços na produção de enzimas, impulsionando a indústria biotecnológica e seu impacto positivo no meio ambiente (SINGH *et al.*, 2021).

3.3 SUBSTÂNCIAS PÉCTICAS E PECTINASES

3.3.1. Substâncias pécticas

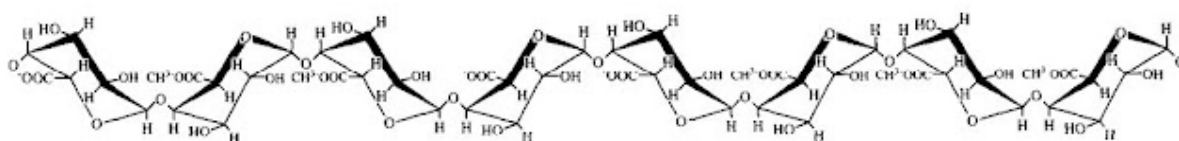
As substâncias pécticas são consideradas macromoléculas de alto peso molecular e desempenham um papel significativo na composição da lamela média. A lamela média é uma camada fina de material presente entre as paredes celulares de plantas superiores. Sua função principal é atuar como uma substância adesiva, proporcionando coesão entre as células vegetais (UENOJO e PASTORE, 2007).

A parede celular principal e a lamela média das plantas superiores são compostas principalmente de heteropolissacarídeos, que também conferem aos tecidos vegetais sua coerência e estabilidade estrutural. Em materiais pécticos, em que o carbono C-6 do galactato é oxidado junto com arabinanos e arabinogalactanos, ramnogalacturonanos e galacturonanos são normalmente os dois principais componentes químicos. Os componentes resultantes têm

uma estrutura significativa de unidades de ácido anidrogacturônico e são materiais poliméricos coloidais estruturalmente heterogêneos (RHEMAN *et al.*, 2021).

A pectina, exemplo dessas substâncias pécticas, é classificada como um heteropolissacarídeo composto, principalmente, por resíduos de ácido gacturônico (GalA) ligados em α (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 3.6), e com grau variável de grupos carboxilas metil esterificados, com resíduos de açúcares do tipo ramnose, arabinose e xilose, como explicitado na Figura 3.7. (CANTERI *et al.*, 2012; VORAGEN *et al.*, 2009).

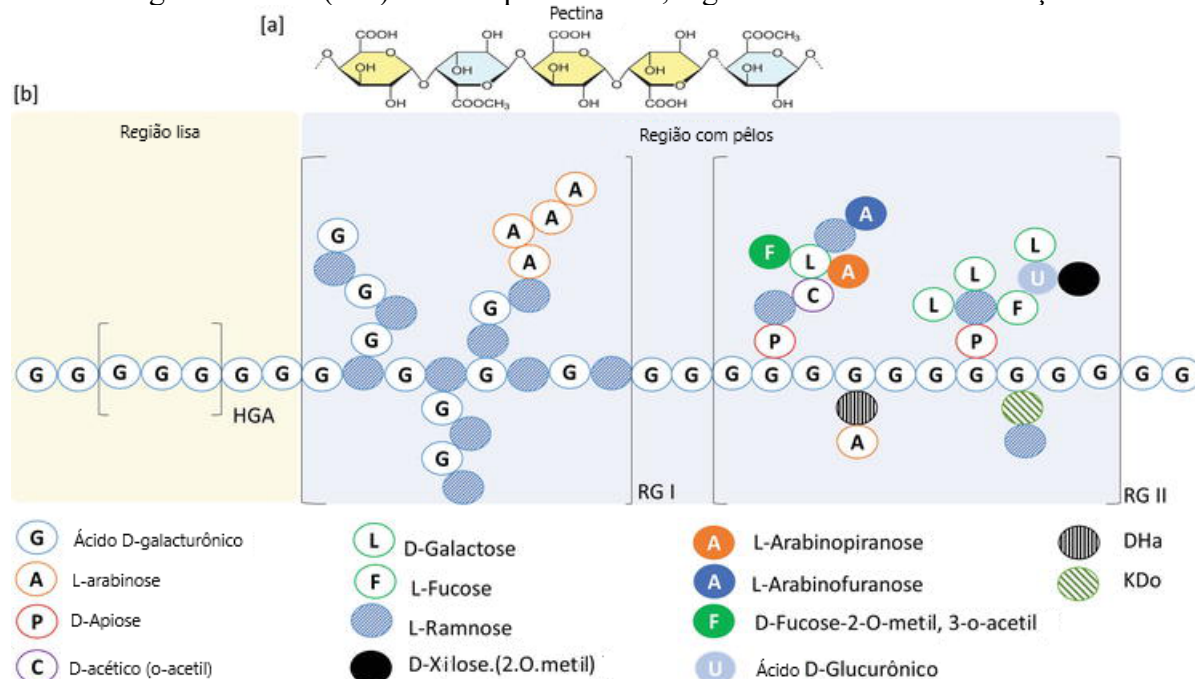
Figura 3.4 - Estrutura da molécula de pectina, exibindo a estrutura do ácido gacturônico parcialmente metilesterificado.



Fonte: Alkorta *et al.*, 1999.

Os grupos carboxila de GalA são neutralizados total ou parcialmente por íons potássio, sódio e amônio, e são parcialmente esterificados por resíduos metila. As unidades de α -1,4-d-gacturonato ligam aproximadamente 2-4% das unidades de L-ramnose, que por sua vez ligam β -(1 $\rightarrow$ 2) e β -(1 $\rightarrow$ 4) a unidades de gacturonato. Carboidratos simples como fucose, xilose, arabinano, gactano ou arabinogactano estão entre as cadeias laterais; no entanto, seu comprimento e composição são diferentes. Devido aos seus átomos C1 e C2, eles estão conectados à cadeia central (MOHNEN, 2008). O ácido gacturônico (GalA) conectado por ligações α -D-1,4 forma a cadeia primária do polímero de pectina, que é composta por três seções principais (KHATTAB, 2022) (Figura 3.7):

Figura 3.5 - (a) Estrutura da pectina (b) Estrutura da pectina no modelo tradicional exibindo o homogalacturonan (HG) como espinha dorsal, região lisa e resíduo de 60 açúcares.



Fonte: Traduzida de Khattab (2022)

O resíduo D-Galacturônico forma a maioria das moléculas da série. No meio aquoso, os polímeros não são uma cadeia linear; em vez disso, eles são altamente flexíveis e podem dobrar e alongar. Descobriu-se que o arranjo da pectina de várias fontes muda, e as características da pectina estão intimamente ligadas aos resíduos da metilação do ácido galacturônico, que normalmente é de 70% (HAAS *et al.*, 2020). O ácido ferúlico está presente nos terminais não reduzidos dos domínios contendo arabinose neutra e/ou galactose na pectina ácida e neutra. Devido às interações entre sua estrutura de domínio e outros produtos químicos inorgânicos e orgânicos ionizados, a pectina possui aproximadamente um resíduo teruloil para cada matriz (YAPO *et al.*, 2007).

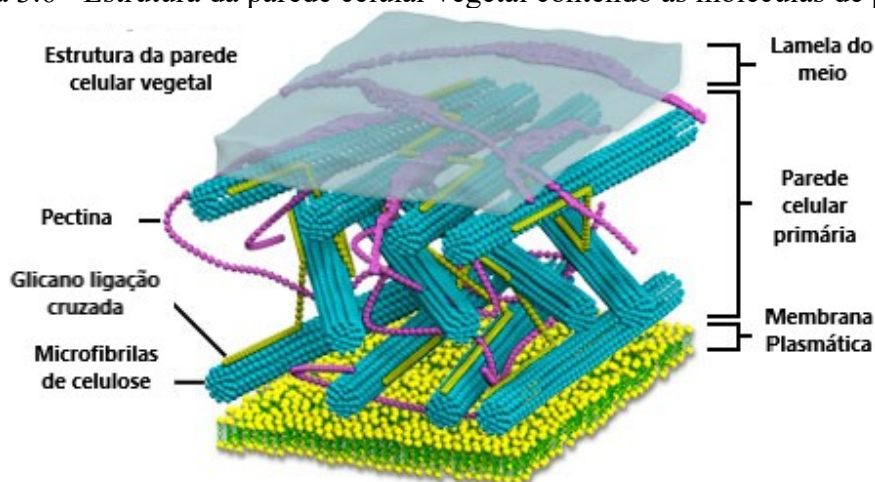
O teor de substâncias pécicas pode variar de acordo com o vegetal e sua origem. Diversas fontes de substâncias pécicas são encontradas na natureza, como o bagaço de maçã, albedo cítrico (maracujá, laranja, entre outros), polpa de beterraba, sementes de girassol, bem como em muitos outros frutos (CANTERI *et al.*, 2012).

De acordo com as definições do comitê da *American Society*, as substâncias pécicas podem ser classificadas da seguinte forma: protopectinas que são substâncias precursoras das substâncias pécicas e caracterizam-se por serem insolúveis em água. Quando são hidrolisadas, dão origem à pectina ou aos ácidos pécicos; ácido pécico que se trata de um polímero solúvel composto por ácido galacturônico, com uma quantidade insignificante de grupos metil

esterificados. Os sais desses ácidos são denominados pectatos, como os ácidos pectínico que se refere ao ácido poligalacturônico coloidal, que apresenta uma quantidade significativa de grupos metil esterificados (superior a zero e inferior a 75%). Enquanto isso, os sais desses ácidos são chamados de pectinatos, como a pectina que é um material polimérico no qual pelo menos 75% dos grupos carboxila do ácido galacturônico estão esterificados com metanol (BECKMAN, 2019).

A presença de pectina confere rigidez à parede celular quando está ligada à celulose. Durante o amadurecimento das frutas, a estrutura da pectina é alterada por enzimas presentes naturalmente. Conforme descrito por Smith (2018), essas alterações incluem a quebra das cadeias da pectina ou das cadeias laterais ligadas às unidades que compõem a cadeia principal. Essas modificações resultam em uma pectina mais solúvel, diminuindo sua força nas paredes celulares adjacentes e causando amolecimento do tecido vegetal (Figura 3.8).

Figura 3.6 - Estrutura da parede celular vegetal contendo as moléculas de pectina



Fonte: Molecular Expressions (2015)

De acordo com Smith *et al.* (2009), a pectina é uma mistura de diferentes compostos, sendo o ácido pectínico o componente predominante. Essa substância é encontrada na forma nativa na parede celular e pode estar interligada a outros polissacarídeos estruturais e proteínas, formando a protopectina insolúvel. As substâncias pécticas podem variar em relação ao grau de esterificação metílica, proporção de açúcares neutros e grau de polimerização, dependendo de sua origem (SMITH *et al.*, 2009). Além disso, essas substâncias podem apresentar esterificação adicional com ácido acético nos carbonos 2 e 3 da unidade de ácido galacturônico, o que contribui para aumentar a heterogeneidade desses compostos (JONES *et al.*, 2012).

As pectinas são polissacarídeos compostos por dezessete monossacarídeos diferentes, que se organizam em diversas estruturas através de mais de vinte tipos de ligações para formar uma rede (VORAGEN *et al.*, 2009; VINCKEN *et al.*, 2003). As pectinas são compostas por cadeias que englobam ácidos urônicos, hexoses, pentoses e metilpentoses. Essas cadeias podem apresentar substituições de metanol, ácido acético e ácidos fenólicos. Os açúcares encontrados nas pectinas podem existir tanto na forma furanosídica quanto na forma piranosídica, e podem exibir diferentes anômeros (AXELOS e THIBAUT, 1991). Além disso, as pectinas podem apresentar uma variedade de ligações entre os monômeros, incluindo α (1 $\rightarrow$ 4), α (1 $\rightarrow$ 5), β (1 $\rightarrow$ 3), β (1 $\rightarrow$ 4) e β (1 $\rightarrow$ 6) (ZUDNEK *et al.*, 2021).

A pectina é composta por diferentes tipos de cadeias, incluindo a homogalacturonana (HG), a ramnogalacturonana I (RG-I), a ramnogalacturonana II (RG-II), a xilogalacturonana (XGA), a arabinogalactana I (ARA-I), a arabinogalactana II (ARA-II), a arabinana (ARA) e a apiogalacturonana (API). A HG corresponde a cerca de 60-65% do total da pectina e possui unidades de ácido α -D-galactopiranosilurônico em ligações 1 $\rightarrow$ 4. As cadeias de HG podem apresentar metil-esterificações parciais nas carboxilas e, dependendo da fonte vegetal, podem ser parcialmente acetiladas no C-3 ou C-2 (WILLATS *et al.*, 2003).

A RG-I é representada por um dissacarídeo [$\rightarrow$ 4- α -D-GalA-(1 $\rightarrow$ 2)- α -LRha-(1 $\rightarrow$) $_n$, sendo uma cadeia que contém unidades de ramnose e diversas cadeias de glucanas (principalmente arabinana e galactana) ligadas a ela. A RG-I corresponde a 20-35% da pectina e possui uma composição heterogênea de açúcares (WILLATS *et al.*, 2003). A RG-II é o segmento mais complexo da pectina, representando 10% da composição. Essa estrutura é composta por um esqueleto de homogalacturonana com unidades monoméricas e cadeias laterais contendo diversos tipos de açúcares peculiares. A XGA é uma homogalacturonana com substituição de xilose na posição 3, podendo variar em grau de xilosidação (WILLATS *et al.*, 2003).

A ARA-I é composta por um esqueleto β -D-Galp com resíduos de α -L-Araf ligados às unidades galactosil na posição 3. A ARA-II está associada principalmente a proteínas, sendo composta por um esqueleto β -D-Galp 1 $\rightarrow$ 3 com cadeias curtas de α -L-Araf. A ARA é formada por um esqueleto de α -L-Araf com cadeias laterais de α -L-Araf. A API é uma HG substituída por D-apiofuranose no O-2 ou O-3 e está presente em certas plantas aquáticas. Diante do exposto é que estudos têm permitido a elaboração de estruturas hipotéticas da pectina, com modificações baseadas em novas evidências analíticas (WILLATS *et al.*, 2003).

Unidades de L-arabinose ou ácido D-galacturônico são normalmente encontradas nas cadeias laterais de ramnogalacturonanos. Aproximadamente 60-70% das unidades de

galacturonato nos tecidos vegetais são esterificadas com metanol, e o etanol também é usado com pouca frequência. Os compostos pécticos são categorizados como protopectina, ácido pectínico, pectina e ácido poligalacturônico de acordo com o grau de esterificação (Tabela 3.4). Uma das principais causas da heterogeneidade nos compostos pécticos é o tamanho molecular, o grau de esterificação e a distribuição de peso dos resíduos de ácido poligalacturônico. Os compostos pécticos que foram extraídos de diversas fontes, incluindo frutas cítricas, maçãs e ameixas, têm pesos moleculares relativos que variam de 25 a 350 kDa.

Tabela 3.3 - Diferentes tipos de substâncias pécticas

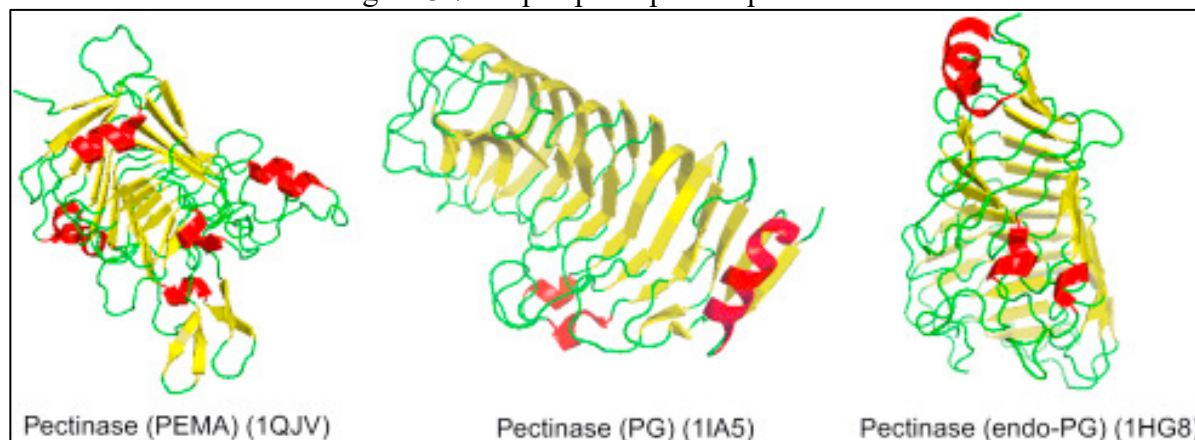
Substância péctica	Descrição estrutural	Propriedades
Protopectina	Unidades de galacturonato ligadas por ligações - 1,4-glicosídicas. Os grupos carboxila são altamente esterificados com metanol. O polímero é altamente reticulado com Ca ²⁺ ou com outros polissacarídeos.	Insolúveis em água. Grau de esterificação > 90%
Pectina	Unidades de galacturonato ligadas por ligações - 1,4-glicosídicas. Os grupos carboxila são esterificados com metanol.	Solúvel em água. Grau de esterificação pelo menos 75%
Ácido pectínico	Unidades de galacturonato ligadas por ligações - 1,4-glicosídicas. Os grupos carboxila são ligeiramente esterificados com metanol	Solúvel em água. O grau de esterificação varia entre 0 e 75%
Ácido péctico	Unidades de galacturonato ligadas por ligações - 1,4-glicosídicas.	Solúvel em água. Grau de esterificação 0
Ramnogalacturonano	Unidades de galacturonato ligadas por ligações - 1,4-glicosídicas com unidades de ramnose revestidas por ligações -1,2 e -1,4. As cadeias laterais são polímeros homogêneos de ácido galacturônico e arabinose	Solúvel em água.

Fonte: Adaptado de Gummadi, Manoj e Kumar (2007)

3.3.2. Enzimas pectinolíticas

Uma classe de enzimas conhecidas como pectinases (Figura 3.9) é responsável por catalisar a quebra de compostos pécticos encontrados nas plantas. As pectinases são um grupo de enzimas responsáveis pela degradação das substâncias pécticas encontradas nas plantas (MUKESH KUMAR *et al.*, 2012). Numerosos organismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras, insetos, nematoides, protozoários e plantas, são capazes de produzir enzimas pectinolíticas (BONNIN e PELLOUX, 2020).

Figura 3.7 - Tipos principais de pectinases



Fonte: Liu e Kokare (2023)

Essas enzimas são classificadas em três grupos principais, com base em seus mecanismos de ação sobre as moléculas de polímeros pécticos. O grupo das protopectinases degrada a protopectina insolúvel, originando uma pectina polimerizada altamente solúvel. As esterases atuam na desesterificação da pectina, removendo grupos metoxil das substâncias pécticas e formando ácido péctico. As despolimerases catalisam a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas α (1 $\rightarrow$ 4) presentes nos monômeros de ácido D-galacturônico das substâncias pécticas (JAYANI *et al.*, 2005).

Com base nas formas como atuam na molécula do polímero péctico, as pectinases são categorizadas em três grupos principais: esterases, que catalisam a remoção do grupo metoxil das substâncias pécticas para formar ácido péctico; despolimerases, que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações glicosídicas α (1 $\rightarrow$ 4) entre os monômeros do ácido D-galacturônico de substâncias pécticas; e as esterases, que catalisam a degradação da protopectina insolúvel e produzem pectina polimerizada altamente solúvel (RHEMAN *et al.*, 2021).

A ocorrência de diferentes versões dessas enzimas provavelmente se deve à diversidade de compostos pécticos encontrados nas células vegetais. As pectinases são categorizadas de acordo com seu substrato e mecanismo de reação enzimática (SHET, DESAI e ACHAPPA, 2018). As pectinases reciclam carbono quebrando materiais pécticos em galacturonanos saturados e insaturados. Esses galacturonanos são catabolizados em 5-ceto-4-desoxi-uronato, piruvato e 3-fosfogliceraldeído (GUNJAL *et al.*, 2020).

A classificação das pectinases é baseada no substrato preferencial, no mecanismo de ação e nos sítios de clivagem, resultando em dois grupos principais: despolimerizantes e desmetoxilantes (ALKORTA *et al.*, 1998; KASHYAP *et al.*, 2001). As enzimas desmetoxilantes atuam removendo grupos metil da cadeia principal, enquanto as enzimas

despolimerizantes quebram as ligações $\alpha,1-4$ entre os monômeros de ácido galacturônico, tanto por hidrólise (hidrolases) quanto por trans-eliminação (liases) conforme pode ser analisado no Tabela 3.5.

Tabela 3.4 - Classificação das enzimas pectinolíticas

Enzima	Modo de ação	Substrato preferencial
PECTINASES DESPOLIMERIZANTES		
Poligalacturonase (PG)	hidrólise de ligações $\alpha 1-4$ endo-PG ou exo PG 1 (monômeros) e exo-PG 2 (dímeros)	Ácido pécico
Polimetilgalacturonase (PMG)	hidrólise endo-PMG ou exo-PMG	Pectina
Pectina liase (PL)	trans-eliminação endo-PL ou exo-PL	Pectina
Pectato liase (PAL)	trans-eliminação endo-PL ou exo-PL	Ácido pécico
PECTINASE DESMETOXILANTE		
Pectinesterase (PE)	desesterificação de grupos metil	Pectina

Fonte: Adaptado de Alkorta *et al.* (1998) e Kashyap *et al.* (2001).

As enzimas do grupo de pectinases despolimerizantes têm como função degradar o polímero de pectina ou ácido pécico via hidrólise ou transeliminação. As enzimas que integram o grupo de hidrolases são: as polimetilgalacturonases (PMG), que têm como substrato preferencial a pectina; e poligalacturonases (PG), que atuam preferencialmente sobre ácidos pécicos. Também fazem parte deste grupo as liases, como: a pectina liase (PL), que tem preferência por pectina; e o pectato liase (PGL), que tem preferência por ácido pécico (LIU e KOKARE, 2023).

3.3.2.1. Poligalacturonases – PG

As poligalacturonases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações $\alpha,1-4$ entre resíduos de ácido galacturônico não esterificados. Seus substratos preferenciais são ácidos pécicos ou ácidos poligalacturônicos com baixo grau de esterificação. Sua ação pode ocorrer internamente na cadeia principal, liberando oligômeros (endo-PG), ou na extremidade não-redutora, liberando monômeros (exo-PG).

A hidrólise aleatória das ligações internas da cadeia de ácido poligalacturônico, catalisada pela endo-poligalacturonase (endo-PG) (EC 3.2.1.15), resulta em uma redução

significativa da viscosidade de uma solução, sendo que apenas 2 a 3% da quebra das ligações glicosídicas pode levar a uma redução de viscosidade (FOGARTY e KELLY, 1983). Para essa enzima, a velocidade e proporção de hidrólise são menores quanto maior for o grau de esterificação, uma vez que sua ação catalítica é favorecida na presença de grupos carboxílicos livres (ROUMBOUTS e PILNIK, 1980). As endo-PG são produzidas por uma ampla variedade de organismos, como fungos filamentosos, bactérias, leveduras, plantas superiores e alguns nematóides parasitas de plantas (HAILE e AYELE, 2022).

As exo-poligalacturonases (exo-PG) catalisam a hidrólise das ligações terminais α ,1-4 da cadeia de ácido poligalacturônico. Existem dois grupos de exo-PG diferenciados pelo produto final liberado: exo-PG1 (EC 3.2.1.67), que libera monômeros de ácido galacturônico, e exo-PG2 (EC 3.2.1.82), que libera dímeros (SILVA *et al.*, 1997). À medida que os substratos são hidrolisados pelas exo-PG, ocorre um aumento considerável na concentração de grupos redutores devido à liberação de monômeros de ácido galacturônico, e a viscosidade das soluções diminui lentamente. Uma redução de 50% na viscosidade só é alcançada quando cerca de 35-40% das ligações glicosídicas são hidrolisadas por essa poligalacturonase. As exo-PG são encontradas em diferentes frutas e vegetais e podem ser produzidas por fungos filamentosos e bactérias (SAMANTA, 2019).

Em fungos fitopatogênicos, as poligalacturonases parecem desempenhar um papel como fator de virulência, degradando a pectina presente na parede celular e aumentando a acessibilidade para a degradação por outras enzimas, resultando na lise celular e na destruição dos tecidos da planta (LIPPUNER, CYERT e GASSER, 1996; LANG e DÖRNENBURG, 2000). Nas plantas, essas enzimas desempenham funções importantes, como o reconhecimento de sinais liberados pela ação de fitopatógenos e herbívoros, o que desencadeia respostas de defesa (BERGEY *et al.*, 1999). Além disso, as PGs são essenciais para o amadurecimento de frutas (HADFIELD e BENNETT, 1998).

As PGs presentes em frutas geralmente são inativadas durante o processamento industrial, sendo necessária a adição de enzimas exógenas. Altos níveis de PG são utilizados na produção de alimentos infantis e na estabilização de suco de laranja (Silva *et al.*, 2005). Essas enzimas são empregadas durante a maceração de frutas e na extração e clarificação de vinhos e sucos (LANG e DÖRNENBURG, 2000).

A determinação da atividade enzimática das poligalacturonases pode ser realizada pela medida da redução da viscosidade de uma solução (para endo-PG) ou pelo aumento da concentração de açúcares redutores (para exo-PG), devido à natureza dos produtos liberados por essas enzimas (TOUNSI *et al.*, 2016).

3.3.2.2. Pectina liase – PL

A pectina liase, PL, é uma enzima que rompe as ligações α ,1-4 entre resíduos de ácido galacturônico através do mecanismo de transeliminção. Esse processo resulta na formação de uma dupla ligação entre os carbonos 4 e 5. A enzima PL pode ser dividida em endo-PL e exo-PL, sendo que a endo-PL libera oligômeros de ácido galacturônico e a exo-PL libera monômeros de ácido galacturônico (ULUISIK e SEYMOUR, 2020).

As pectina-liases têm preferência por substratos com alta metilação e apresentam menor afinidade por substratos com menor grau de esterificação (SAFRAN *et al.*, 2023). Por essa razão, essa enzima é capaz de despolimerizar moléculas de pectina altamente esterificada sem a ação prévia de outras enzimas, resultando na diminuição da viscosidade e na clarificação de sucos, sem comprometer o teor de ésteres voláteis responsáveis pelo aroma de várias frutas. Muitas pectina-liases são ativadas pela presença de cálcio (ZHENG *et al.*, 2021).

Ademais, as pectina-liases são predominantemente produzidas por fungos filamentosos e, em sua maioria, são extracelulares (THAKUR *et al.*, 2022). Entre os fungos, destaca-se o gênero *Penicillium*, incluindo espécies como *P. italicum*, *P. digitatum*, *P. griseoroseum* e *P. oxalicum*, devido às características e quantidades de enzimas secretadas (ALANÑA *et al.*, 1990). Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados visando a produção e a caracterização dessas enzimas (SAHARAN e SHARMA, 2019; ZEUNER *et al.*, 2020).

Em infecções causadas por fungos fitopatogênicos, as pectina-liases, juntamente com as poligalacturonases, desempenham um papel no apodrecimento de frutas e vegetais durante o armazenamento (LI *et al.*, 2023). Pectina-liases de fungos não patogênicos atuam na decomposição de matéria orgânica morta. Além disso, essas enzimas possuem importância na indústria têxtil e de alimentos (SAHU *et al.*, 2023; WOJTASIK *et al.*, 2024).

3.3.2.3. Pectinesterase – PE

As pectinesterases (PEs), também conhecidas como desmetoxilantes ou desesterificantes, são pectinases responsáveis pela hidrólise dos grupos metoxil da pectina, resultando na liberação de metanol. A ação da PE tem pouco efeito sobre a viscosidade das soluções. Esta enzima atua sobre a pectina de alta metoxilação e a transforma em pectina de baixa metoxilação, sendo, portanto, imprescindível para a ação de outras pectinases, como as

poligalacturonases, uma vez que estas atuam sobre pectina de baixa metoxilação (VILARIÑO *et al.*, 1993; AIZENBERG *et al.*, 2002).

Estas enzimas são produzidas por plantas, fungos filamentosos, algumas bactérias e leveduras. Além de auxiliar fitopatógenos no processo de infecção em plantas, nutrição e atuar no amadurecimento de frutos, estas enzimas têm um papel importante na indústria de alimentos, disponibilizando pectina de baixa metoxilação para as PGs e para utilização em alimentos com baixas calorias (VILARIÑO *et al.*, 1993; AIZENBERG *et al.*, 2002).

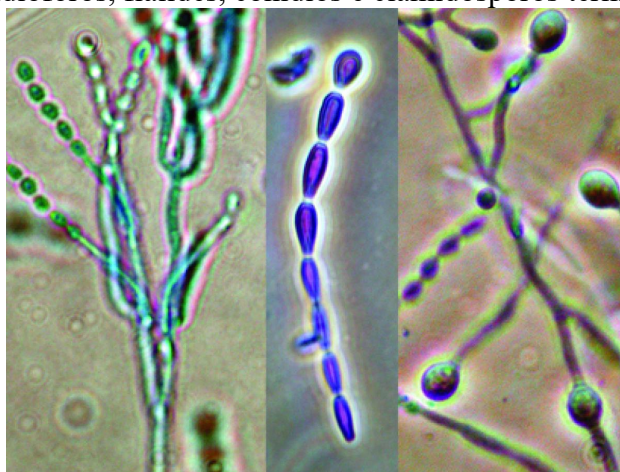
3.3.3. Fungos filamentosos usados na produção de enzimas pectinolíticas

Diversos organismos são capazes de produzir enzimas, incluindo plantas, bactérias, algumas leveduras, fungos filamentosos e organismos simbiotes de animais (LADJAMA *et al.*, 1991; FERNANDES-SALOMÃO *et al.*, 1996; PRADE *et al.*, 1999; SIROTEK *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2005). No entanto, os estudos sobre a produção de pectinases são mais abundantes para fungos filamentosos, uma vez que as enzimas comerciais são principalmente provenientes desses microrganismos (SHRESTHA, RAHMAN e QIN, 2021).

3.3.3.1 *Paecilomyces* sp.

Paecilomyces sp. (Figura 3.10) pertence ao reino Fungi e à divisão Ascomycota, que engloba os fungos filamentosos que produzem esporos assexuados em estruturas denominadas ascos.

Figura 3.8 - Conidióforos, fiáides, conídios e clamidósporos terminais de *P. varios*.



Fonte: University of Adelaide¹ (2020)

¹ Disponível em: <https://www.adelaide.edu.au/mycology/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility/hyphomycetes-conidial-moulds/paecilomyces>.

Infectando humanos e outros vertebrados, *Paecilomyces* é um fungo filamentoso sapróbico comum que pode ser isolado do solo, decompondo vegetação, insetos, nematóides e ar de laboratório (como contaminante). Este gênero contém várias espécies que são patógenos de plantas. Embora as infecções por *P. lilacinus* em pessoas sejam frequentemente relatadas como parte da micobiota do solo, a fonte dessas infecções raramente é identificada (SENTHILKUMAR *et al.*, 2020). A Tabela 3.6 mostra a classificação taxonômica dessa espécie.

Tabela 3.5 - Classificação taxonômica do *Paecilomyces* sp.

Classificação taxonômica	
Reino	<i>Fungi</i>
Divisão	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Sordariomycetes</i>
Ordem	<i>Sordariales</i>
Família	<i>Trichocomaceae</i>
Gênero	<i>Paecilomyces</i>
Espécie	<i>sp.</i>

Fonte: *Integrated Taxonomic Information System (ITIS)*

Paecilomyces é um gênero de fungo ascomiceto amplamente distribuído e com propriedades únicas que lhe permitem crescer em uma variedade de habitats (LI *et al.*, 2020). Suas espécies variam de saprófitas do solo a doenças humanas. As espécies deste gênero diferem na capacidade de produzir uma ampla gama de enzimas bioquímicas, como celulasas, pectinases, quitinases, fitases, tanases, lacases, xilanasas e micotoxinas, bem como nos metabólitos secundários que secretam e que podem ter usos biotecnológicos (HUSSAIN *et al.*, 2012; HANSENS *et al.*, 2015).

Esses fungos são amplamente estudados devido à sua diversidade e ao potencial de produção de enzimas e metabólitos de interesse industrial (LIU *et al.*, 2014). O gênero *Paecilomyces* compreende um grupo heterogêneo de fungos, sendo caracterizado pela formação de conídios unicelulares que são produzidos em estruturas especializadas, conhecidas como conidióforos (LIU *et al.*, 2014).

Uma das espécies mais conhecidas do gênero é o *Paecilomyces lilacinus*, que tem sido amplamente estudado devido à sua capacidade de produzir enzimas como a celulase (WINARSA e MUZAKHAR, 2022), além de apresentar potencial como agente de controle biológico contra nematoides e insetos (MORENO-GAVÍRA *et al.*, 2020; CONSTANTIN *et al.*, 2022). No entanto, existem diversas outras espécies de *Paecilomyces* que também têm

mostrado potencial biotecnológico. Várias cepas de *P. variotii* foram isoladas e avaliadas quanto à sua capacidade de produzir enzimas. Felizmente, algumas destas estirpes foram identificadas como fontes potencialmente úteis de várias enzimas, incluindo amilases (APOSTOLIDI *et al.*, 2020), quitinases (BINH *et al.*, 2019) e xilanases (ABDELLA *et al.*, 2021).

3.3.3.2. *Penicillium* sp.

Um gênero de fungo saprofítico é o *Penicillium* (Figura 3.11). Eles são frequentemente chamados de mofo verde ou azul. Para a fabricação de queijo, ácidos orgânicos e antibióticos, são comercialmente significativos. Como decompositores no meio ambiente, eles são cruciais. *Penicillium* está presente em uma variedade de ambientes, incluindo solo, ar, alimentos em decomposição, etc. Um dos antibióticos mais importantes isolado de *Penicillium* sp. é a penicilina.

Figura 3.9- Corpo de frutificação do *Penicillium* sp.



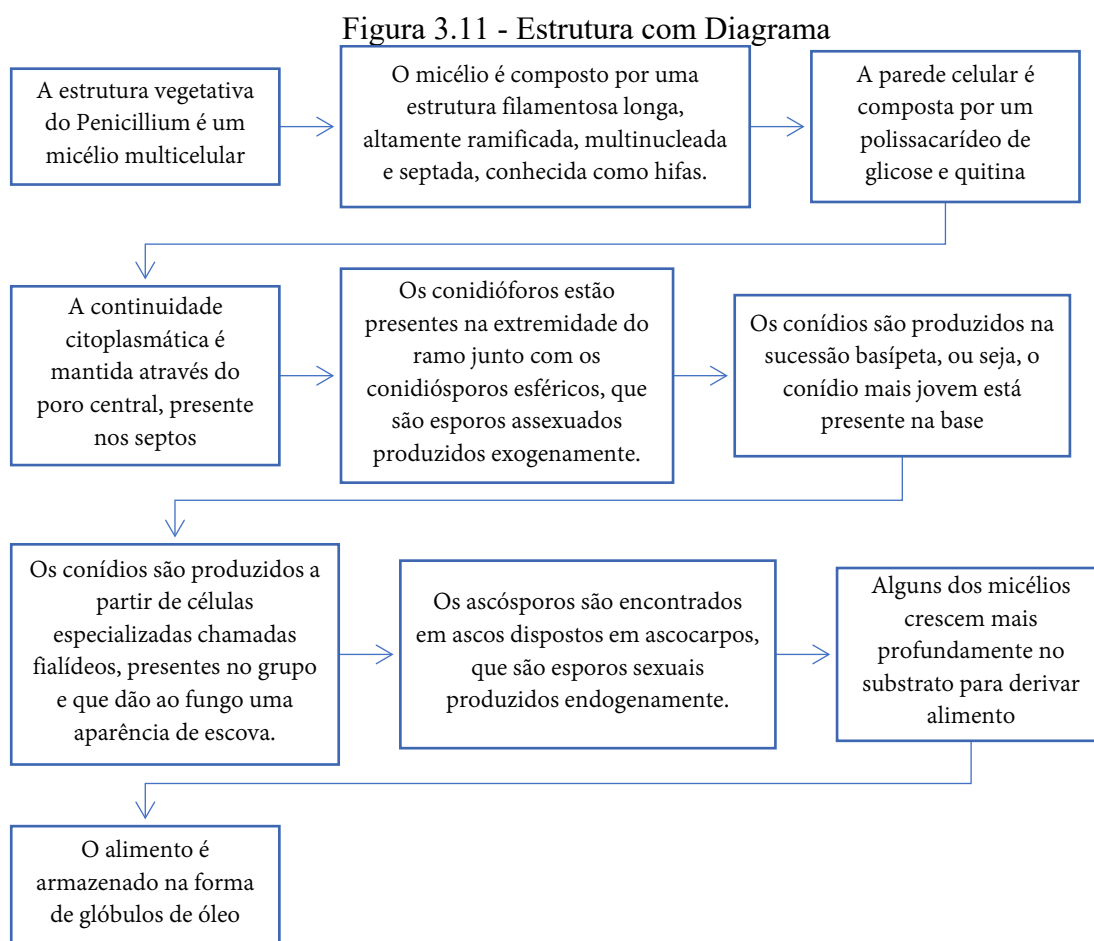
Fonte: Só Biologia² (2020)

O gênero *Penicillium* pertence ao filo Ascomycota ou Ascomycetes. Sua classificação é baseada nos ascósporos que produzem durante a reprodução sexuada. *Penicillium* se traduz como “pincel de pintor”. Seu nome vem das cadeias de conídios formadas assexuadamente que emergem como uma escova terminal no micélio.

²Disponível em: <http://www.sobiologia.com.br>.

Penicillium sp é um fungo teleomórfico (sexual) membro do grupo de fungos Trichomaceae, bem como da ordem Eurotiales, classe Eurotiomycetes e subclasse Eurotiomycetidae. Segundo Kimata *et al.* (1978), estes incluem fungos conidiais sapróbicos amplamente distribuídos, que crescem em vários substratos, *Penicillium*, e o agente causal de apodrecimento em citrinos, podridões de frutos que são frequentemente experimentadas no período pós-colheita. Estes são patógenos fracos que têm como alvo órgãos de reserva como frutas e sementes.

Eles também podem causar a produção de micotoxinas nas sementes. Os gêneros *Talaromices* e *Eupenicillium* contêm os estágios teleomórficos das espécies de *Penicillium*. O ascoma não possui himênio e é cleistotecial, com os ascos dispersos por sua cavidade. Quando os ascósporos amadurecem, a parede arredondada do asco se rompe. Os conídios desenvolvem-se em cadeias finas, longas e brilhantes. Os conidióforos são lisos, ovais, assimétricos e relativamente grandes (BODADE *et al.*, 2010). A estrutura do *Penicillium* é composta pelo micélio, parede celular, poro central, conidióforos, conídios, fialídeos, ascósporos, conforme mostrado no fluxograma a seguir (Figura 3.11):



Fonte: Goswami (2020)

Penicillium se reproduz por meios vegetativos, assexuados e sexuais. Na reprodução vegetativa, a fragmentação é utilizada para criar novas plantas; cada fragmento cresce sozinho em um micélio inteiro. A reprodução assexuada ocorre em estruturas únicas conhecidas como conidióforos (LOPÉZ-VILLAVIVENCIO *et al.*, 2010).

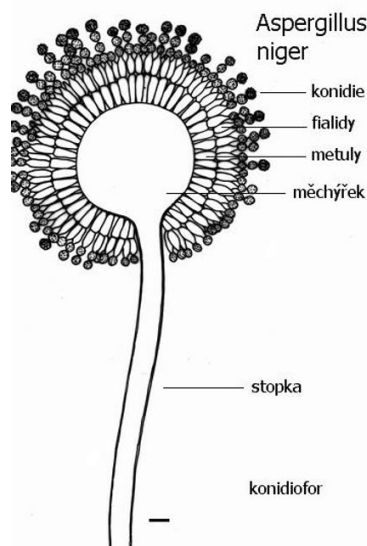
A diversificada gama de enzimas extracelulares geradas pelas espécies de *Penicillium* é crucial para a degradação microbiana de moléculas orgânicas. Várias enzimas celulolíticas e outras polissacarases, como α - e β -glucanases, hemicelulases e enzimas pécnicas, bem como uma variedade de lipases e enzimas proteolíticas que são conhecidas por serem responsáveis pelo desenvolvimento de sabores distintos em queijos curados, são exemplos notáveis de hidrolases de *Penicillium* (HAMLYN, WALES e SAAGR, 1987).

Como fungos do solo, estudos demonstraram a capacidade das cepas de *Penicillium* de metabolizar hidrocarbonetos (YANG *et al.*, 2023) e criar enzimas extracelulares (PAN *et al.*, 2023; SINITSYN *et al.*, 2021). As cepas de *Penicillium* têm a capacidade de criar celulose (LI *et al.*, 2021; XIE *et al.*, 2023), mananase (BANDORIA, DIVECHA e SHAH, 2021; FODA *et al.*, 2022; BANGORIA, PATEL e SHAH, 2023) e pectinase (AHMED e RAHMAN, 2021; MACEDO *et al.*, 2023; NUÑEZ-SERRANO *et al.*, 2024), o que sugere que essas cepas podem utilizar uma variedade de resíduos agrícolas. A possibilidade de produzir estas enzimas caras poderia ser levada em consideração para aplicações biotecnológicas.

3.3.3.3. *Aspergillus* sp.

Fungos filamentosos conhecidos como espécies de *Aspergillus* são frequentemente encontrados no solo, decompondo matéria vegetal, sementes e grãos, onde florescem no papel de saprófitas. Com cerca de 250 espécies, *Aspergillus* é um gênero relativamente grande. Estas espécies são atualmente categorizadas em sete subgêneros, que são divididos em múltiplas seções compostas por espécies relacionadas (RAPER e FENNELL, 1965; GAMS *et al.*, 1985; GEISER *et al.*, 2007). A morfologia está demonstrada na Figura 3.12.

Figura 3.10 -Morfologia do *Aspergillus* sp.



Fonte: Adaptado de Taniwaki, Pitt e Magan (2018)

As hifas são hialinas e septadas. A célula basal do pé nas hifas de suporte é onde começam os conidióforos e terminam em uma vesícula na ponta. A formação normal do *Aspergillus* é uma vesícula. Diferentes espécies têm diferentes morfologias e cores de conidióforos. As fiálides em forma de frasco cobrem total ou parcialmente a superfície superior da vesícula. As fiálides são bisseriadas, aderindo à vesícula através de uma célula de suporte conhecida como métula, ou unisseriadas, fixando-se diretamente à vesícula. Os conídios esféricos que formam cadeias radiais estão situados acima das fiálides (AFZAL *et al.*, 2013; ZULKIFLI e ZAKARIA, 2017).

As espécies de *Aspergillus* têm sido utilizadas há muito tempo como organismos modelo no estudo do crescimento de fungos filamentosos. Isso ocorre porque seus sistemas de reprodução sexual homotático (autofértil) e heterotático (cruzamento obrigatório), bem como sua morfologia de desenvolvimento assexuado bem caracterizada, os tornam simples de cultivar e manipular em laboratório. Desde a sua criação como organismo modelo por Pontecorvo (1953), a espécie homotática *A. nidulans* em particular tem sido amplamente utilizada para estudos sobre a base genética da esporulação assexuada e sexual (OJEDA-LÓPEZ *et al.*, 2018; ETXEBESTE e ESPESO, 2020; SON *et al.*, 2023).

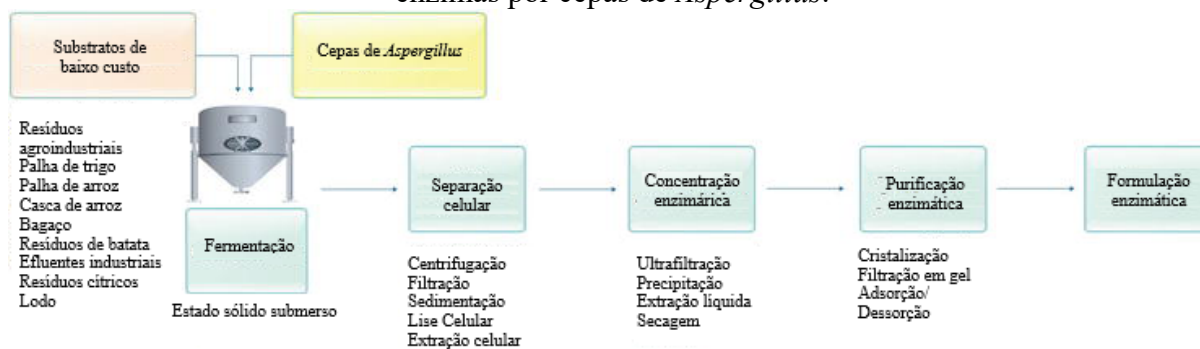
Os esporos assexuados conhecidos como conídios, produzidos em grandes quantidades pelas espécies de *Aspergillus*, são amplamente reconhecidos. Embora ocasionalmente existam casos isolados de *Aspergillus* com morfologias distintas da cabeça dos conídios, estes são gerados a partir de conidióforos que compartilham a morfologia distinta do

Aspergillus, que consiste em células do pé, pedúnculos e métulas com vesículas e fiálides com conídios radiantes (YU, 2010; SAMSON *et al.* 2014). Em *A. nidulans*, milhares de genes são regulados durante o início da conidiação (GARCIA *et al.*, 2013; CÁNOVAS *et al.*, 2014). Esses genes incluem reguladores centrais, responsivos à luz e aveludados, bem como uma variedade de ativadores a montante e repressores negativos.

As infecções fúngicas das plantas resultam naturalmente na produção de enzimas pelos fungos. Diversos fungos que causam doenças em plantas, como conhecidos como fungos fitopatogênicos, produzem enzimas extracelulares significativas que são indicativas de sua patogenicidade e são utilizadas no processo de patogênese, bem como na degradação e transporte de nutrientes para as células (FONSECA *et al.*, 2018).

O fungo *Aspergillus* sp. destaca-se pela capacidade de produzir inúmeras enzimas, tornando-o um dos principais microrganismos de interesse industrial. Como por exemplo, esse fungo pode produzir lipases (TACIN *et al.*, 2018), por meio de fermentação submersa; pectinases (RÊGO *et al.*, 2019), por meio de fermentação em estado sólido e celulases (SIVA *et al.*, 2022). Na Figura 3.13, pode-se observar uma visão geral do processo de produção de enzimas por *Aspergillus*:

Figura 3.11 - Etapas do processo para conversão de substrato de baixo custo em diversas enzimas por cepas de *Aspergillus*.



Fonte: Gholami-Shabani *et al.* (2021)

A lise ou extração celular ocorre após a fermentação, seja na forma submersa ou sólida. Os detritos celulares são então removidos da cultura usando centrifugação, filtração ou sedimentação. Depois disso, a cultura isenta de células é concentrada por extração líquida utilizando solventes orgânicos, precipitação com sulfato de amônio ou ultrafiltração. Uma combinação de várias técnicas cromatográficas, tais como cromatografia de afinidade e filtração em gel, é então empregada (GHOLAMI-SHABANI *et al.*, 2021).

As enzimas são secretadas em quantidades consideráveis pelas espécies de *Aspergillus* (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011). Comparado aos fungos, que normalmente são considerados os maiores produtores de proteases, este gênero é capaz de atingir níveis mais elevados de atividade enzimática. As proteases são as mais comuns entre as enzimas liberadas pela espécie (CARVALHO *et al.*, 2012).

Em sua revisão, Gholami-Shabani *et al.* (2021) identificou que as espécies de *Aspergillus* tem potencial para produção de enzimas tanto pela fermentação submersa quanto pela fermentação por estado sólido, em que foram identificados estudos envolvendo a produção de enzimas como amilase, celulase, quitosanase, galactosidase, invertase, lacase, lipase, naringinase, pectinases, fitase, proteases e tanase, com diferentes tipos de fermentação e utilizando diferentes tipos de substratos. No que se refere as pectinases, as espécies *A. niger*, *A. carneus* NRC1, *A. flavipes* FP-500, *A. tamarii*, *A. flavus* CECT-2687 e *A. japonicus* receberam destaque.

De acordo com Nuñez-Perez *et al.* (2022), *Aspergillus* sp. possui um suprimento abundante de maquinaria enzimática que lhe permite utilizar a biomassa das plantas, é um fungo perfeitamente adaptado a uma variedade de habitats, mas são necessários estudos avançados para confirmar se a produção de enzimas pectinolíticas está ligada ao crescimento fúngico. Portanto, as enzimas são produzidas para facilitar a quebra de nutrientes do meio para garantir o crescimento do fungo.

3.3.4. Aplicações de enzimas pectinolíticas

A produção de enzimas pectinolíticas tem despertado interesse na comunidade científica. Segundo Mangrio *et al.* (2023), relataram a capacidade de microrganismos, principalmente fungos filamentosos, em produzir enzimas com atividade pectinolítica, indicando um potencial para aplicações nas indústrias de alimentos e de bebidas.

As enzimas pectinolíticas têm diversas aplicações industriais e são amplamente utilizadas. No mercado global de enzimas, correspondem a aproximadamente 25% da produção total (MOKRANI e NABTI, 2024). As pectinases são adicionadas aos purês de frutas e vegetais para quebrar a pectina, reduzindo a viscosidade e aumentando o rendimento do suco. Além disso, conferem ao produto acabado uma aparência cristalina e encurtam o tempo de filtração (RUIZ *et al.*, 2017).

Em particular, nas indústrias de sucos de frutas, as pectinases são adicionadas para degradar a pectina e outros componentes de alto peso molecular, o que resulta na redução da

viscosidade dos sucos, no aumento do rendimento de extração, na obtenção de uma aparência cristalina do produto final e na diminuição do tempo de filtração (DAS *et al.*, 2023; CHEN *et al.*, 2023). Na indústria vinícola, as pectinases são utilizadas durante o processo de esmagamento das uvas para melhorar a extração do suco e reduzir o tempo necessário para a clarificação (QUEIRÓS *et al.*, 2023).

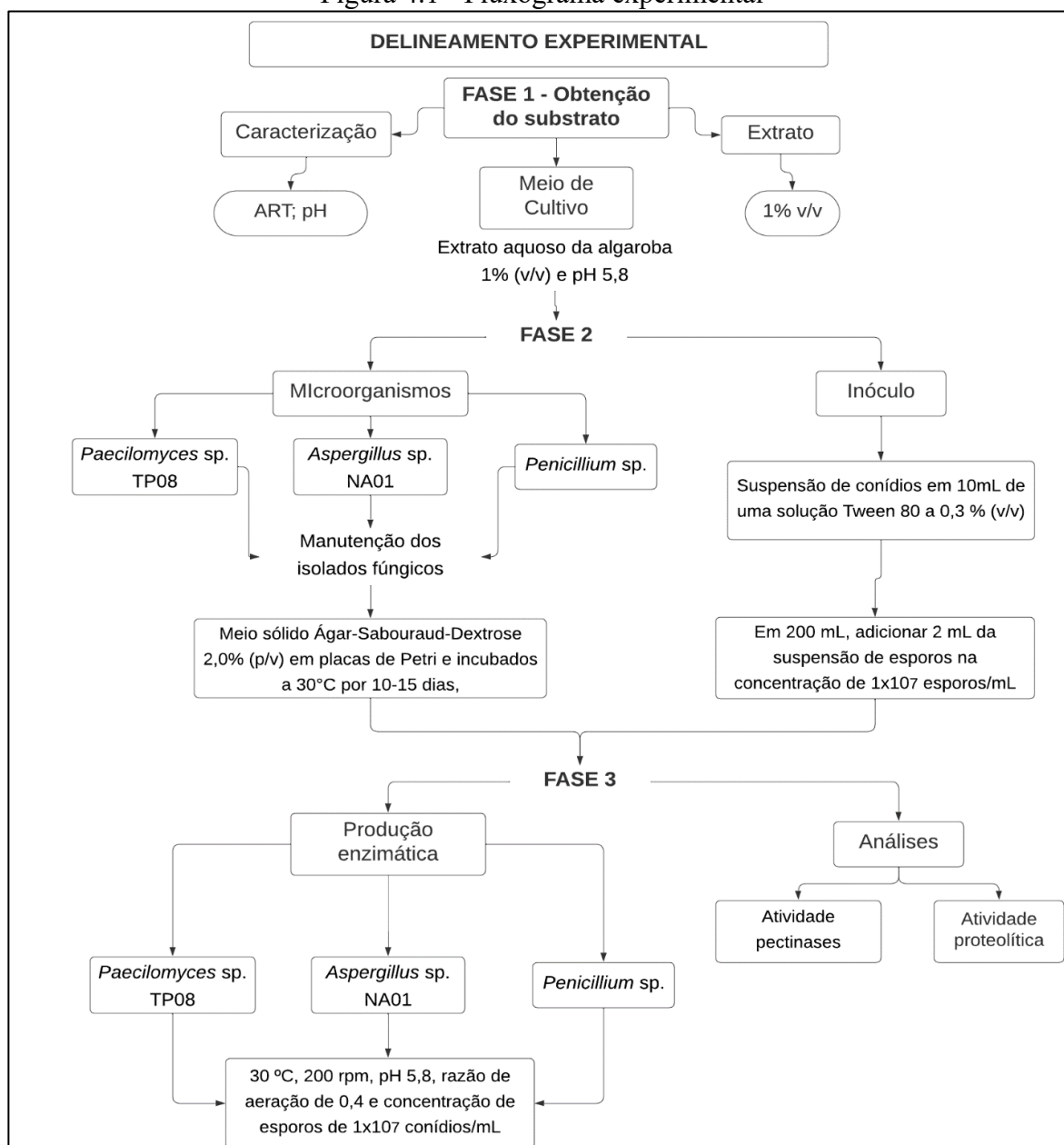
Além disso, essas enzimas desempenham um papel importante na indústria têxtil, onde são empregadas para degradar a camada de pectina que reveste as fibras de celulose, permitindo seu processamento posterior (RAHMAN *et al.*, 2023). Também são aplicadas no tratamento de resíduos líquidos e na degomagem de fibras naturais (ABIDIN *et al.*, 2023). Na indústria de ração animal, as pectinases, juntamente com outras enzimas, são utilizadas para reduzir a viscosidade do produto, melhorar a absorção e a liberação de nutrientes, promovendo a hidrólise de fibras não biodegradáveis e nutrientes bloqueados pelas fibras (AZZAZ *et al.*, 2021).

4. METODOLOGIA

4.1. FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL

O desenvolvimento do experimento foi realizado em três etapas: obtenção do extrato, caracterização do substrato, produção e análise enzimática. A sequência experimental pode ser visualizada na Figura 4.1.

Figura 4.1 - Fluxograma experimental



Fonte: próprio autor. ART – Açúcares Redutores Totais; pH – Potencial Hidrogeniônico; v/v – volume-volume.

4.2 SUBSTRATO

O substrato utilizado na produção enzimática foi o extrato aquoso da algaroba, obtido das vagens da algaroba oriundas da cidade de Japi, localizado na microrregião da Borborema Potiguar – RN. A obtenção do extrato aquoso da algaroba foi baseada na metodologia descrita por Silva (2009).

Os extratos aquosos de algaroba de diferentes lotes (2018 e 2023) utilizados como substrato para produção enzimática em diferentes concentrações (1 e 10% (v/v)) foram avaliados quanto ao teor de sólidos solúveis totais (SST) em termos de °Brix, à quantidade de açúcar redutor total (ART) e pH.

Vale salientar que o extrato aquoso da algaroba (lote 2018) a 10% (v/v) foi utilizado como substrato para os cultivos de seleção do isolado fúngico com mais habilidade em produzir enzimas pectinolíticas. O extrato aquoso da algaroba (lote 2023) a 1% (v/v) foi utilizado como substrato para o acompanhamento cinético da produção enzimática com o isolado selecionado. Além dos substratos, as análises quanto à quantidade de SST e teor de pectato de cálcio (pectina) foram realizadas em sucos (caju e maçã) utilizados para o teste de clarificação, como forma de verificar o potencial de aplicação do caldo enzimático produzido, de acordo com as metodologias propostas por Silva *et al.* (2018) e Santos *et al.* (2021).

4.2.1 Caracterização do substrato

O extrato aquoso de algaroba foi caracterizado por meio das seguintes análises:

4.2.1.1 Teor de sólidos solúveis totais (SST)

O teor de sólidos solúveis totais (SST) foi determinado por meio de equipamento denominado refratômetro portátil com compensação automática de temperatura (ATC - Brewparts) que fornece os valores em °Brix (SANTOS *et al.*, 2021).

4.2.1.2 Determinação de açúcares redutores totais (ART)

A quantificação de açúcares redutores totais (ART) foi realizada pela análise do meio composto por 1% e 10% (v/v) de extrato aquoso de algaroba utilizando o método do DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) proposto por Miller (1959) adaptado por Vasconcelos (2013).

Uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi adicionada a 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl a 2N) em um tubo de ensaio. O conjunto foi levado ao banho-maria (SevenLabor) por 10 min sobre a temperatura de 70 °C. Após realizada a hidrólise foram adicionados 2,0 mL de solução de NaOH a 2,0 N, após neutralização da mistura, transferiu a amostra para um balão volumétrico de 50 mL, completou o volume do balão volumétrico com água destilada para diluição.

Em seguida, uma alíquota de 0,5 mL da amostra hidrolisada foi adicionada a 0,5 mL do reagente DNS em tubo de ensaio. A amostra foi levada ao banho-maria (SevenLabor) a 100 °C por 5 min. Após aquecimento, os tubos foram colocados em banho de gelo por 5 min. Por último, adicionou-se 4 mL de água destilada a amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. O branco analítico foi composto de 0,5 mL de água destilada ao invés da amostra. Cada amostra foi analisada em triplicata.

4.2.1.3 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) do extrato aquoso da algaroba, nas concentrações de 1% e 10% (v/v), foi realizada em um pHmetro de bancada (MS – Tecnopon – mPA-210).

4.2.1.4 Determinação do teor de pectina

Em um béquer de 250 mL, foi colocado 60 mL da amostra e acrescentou-se 100 mL de água deionizada. Ferveu-se lentamente durante 1 h, recolocando a água perdida por evaporação. Deixou-se esfriar o conteúdo do béquer, agitou-se bem. Em seguida, pipetou-se uma alíquota de 100 mL e transferiu-se para um béquer de 600 mL, adicionou-se 300 mL de água deionizada e 10 mL de hidróxido de sódio 1 M, agitando-se continuamente e então se deixou em repouso durante a noite. No dia seguinte adicionou-se 50 mL da solução de ácido acético 1 M sob agitação, aguardou-se 5 min e adicionou-se sob agitação 50 mL da solução de cloreto de cálcio 1 M e levou-se à fervura por 1 min. Posteriormente, deixou-se em repouso por 1 h e filtrou-se em papel filtro Whatmann nº 1 lavando-se o precipitado com água deionizada quente, quase em fervura até remover todo o cloreto livre. O resíduo do filtro foi transferido para uma placa de Petri previamente tarada e foi transferido para a estufa à 40 °C e permaneceu durante a noite. No terceiro dia, a placa de Petri foi retirada da estufa e pesada, metodologia adaptada de Sebastião (2015) e Andrade *et al.* (2018).

O teor de pectina foi determinado conforme Equação 4.1:

$$g \text{ de pectato de cálcio (\%)} = \frac{g \text{ de pectato de cálcio} \times 100}{\text{peso da amostra}} \quad (4.1)$$

4.3 MICRORGANISMOS

Para produção enzimática foram utilizados os isolados fúngicos *Paecilomyces* sp. TP08 (isolado de óleo diesel/Posto de gasolina/João Pessoa/ Paraíba – 2014), *Aspergillus* sp. NA01 e *Penicillium* sp., todos cedidos pelo Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia Vegetal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, utilizando a metodologia de Santos *et al.* (2021).

Para manutenção dos isolados fúngicos, foi realizado o repique das culturas dos fungos em meio sólido Ágar-Sabouraud-Dextrose 2,0% (p/v) (5 g/L de peptona de carne, 20 g/L de glicose, 5 g/L de peptona de caseína e 15 g/L de ágar bacteriológico em placas de Petri e incubados a 30 °C por 10-15 dias, para seu desenvolvimento micelial, após crescimento foi armazenado a 4 °C.

Para o preparo do inóculo, foi preparada uma suspensão de conídios dos fungos adicionando-se 10 mL de uma solução Tween 80 a 0,3 % (v/v) na placa de Petri e, com o auxílio de uma alça de platina, foi realizada a raspagem de conídios da superfície do meio. Após homogeneização, a solução foi transferida para um tubo de centrífuga (50 mL) esterilizado para a quantificação de conídios e posterior inoculação.

A determinação da concentração de conídios na suspensão foi feita por meio de contagem em Câmara de Neubauer, e calculada de acordo com a Equação 4.2. E o volume de suspensão a ser inoculado ao meio de fermentação foi calculado conforme a Equação 4.3, ajustado de modo a ter-se uma concentração do inóculo de 1×10^7 conídios por mL de meio.

$$C_{\text{esporos}} \left(\frac{\text{esporos}}{\text{mL}} \right) = \bar{E} \times 5 \times 10^4 \times F_D \quad (4.2)$$

$$V_{\text{suspensão}} (\text{mL}) = \frac{C_{\text{inóculo}} \left(\frac{\text{esporos}}{\text{mL}} \right) \times V (\text{mL})}{C_{\text{esporos}} \left(\frac{\text{esporos}}{\text{mL}} \right)} \quad (4.3)$$

Em que:

$\bar{E}$ é a média de esporos contados na Câmara de Neubauer;

C_{esporos} é a concentração de esporos na suspensão;

$C_{\text{inóculo}}$ é a concentração de inóculo;

F_D é o fator de diluição para a contagem na Câmara de Neubauer;

V , volume de meio do processo de produção enzimática.

4.4 PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo do inóculo foi usado um frasco erlenmeyer de 500 mL com volume de meio de 200 mL (Extrato aquoso da algaroba a 10% (v/v)) e uma alíquota de 2 mL da suspensão de esporos na concentração de 1×10^7 esporos/mL foi adicionada, deixado em *shaker* nas condições estabelecidas (200 rpm a 30 °C). Após, a densidade ótica (comprimento de onda a 600 nm) foi medida e ao atingir a absorbância entre 0,6 e 0,8 o inóculo estava pronto para ser adicionado aos frascos de cultivo. Para cada frasco contendo 100 mL de meio de cultivo foi adicionada uma alíquota de 10 mL de inóculo.

4.5 CULTIVOS PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

Os cultivos foram realizados para verificar a atividade enzimática com os isolados fúngicos propostos (*Paecilomyces* sp. TP08, *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. NA01) em meio extrato aquoso da algaroba a 10% (v/v) nas seguintes condições de processo: 30 °C, 200 rpm, pH 5,8, razão de aeração de 0,4 e concentração de esporos de 1×10^7 conídios/mL.

O processo para cada isolado fúngico foi realizado em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo, os frascos foram esterilizados em autoclave (121 °C, 1 atm por 15 min). Em seguida, foi realizado a inoculação em cada frasco de cultivo. Todos os frascos foram colocados em agitação orbital a 200 rpm e em temperatura ambiente (30 ± 2 °C) durante 10 dias de cultivo. Amostras foram retiradas diariamente para quantificação da biomassa microbiana, do substrato e da produção de enzimas pectinolíticas. Todos os experimentos e análises foram realizados em triplicata.

4.5.1 Análises do processo de produção enzimática

4.5.1.1 Determinação da concentração de biomassa microbiana

O crescimento microbiano foi acompanhado pelo método gravimétrico por peso seco. O peso seco foi determinado por retirada de uma alíquota de 5 mL de caldo e filtrado em papel qualitativo previamente pesado. A amostra foi filtrada em filtração a vácuo, e ao final da filtração, descartou-se o filtrado e o *pellet* sedimentado no papel de filtro foi levado a estufa (85 °C por 24 h). Todo o procedimento foi realizado em triplicata. O peso seco foi determinado de acordo com a Equação 4.4:

$$\text{peso seco} \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{m_{\text{após estufa}} - m_{\text{papel de filtro tarado}}}{v} \quad (4.4)$$

Em que:

- $m_{\text{após estufa}}$: massa do conjunto células e papel de filtro após secagem;
- $m_{\text{papel de filtro tarado}}$: massa do papel de filtro seco.

4.5.1.2 Determinação da concentração de substrato

A quantificação do substrato foi realizada pela análise do caldo fermentado isento de células utilizando o método do DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) proposto por Miller (1959) adaptado por Vasconcelos (2013), conforme detalhado no item 4.2.1.2.

4.5.1.3 Determinação da atividade de pectinases

Para determinação da atividade pectinolítica foi utilizada pectina cítrica (P.A) a 0,6% (p/v) em tampão acetato (pH 5,5) como substrato específico, adicionado o caldo enzimático obtido dos cultivos, procedimento adaptado da metodologia descrita por Pinheiro (2007). Em tubos de ensaio contendo 2 mL da solução de pectina, foram adicionados 0,25 mL do caldo enzimático e em seguida incubados a 35 °C durante 30 min para proceder a reação enzimática. Após isso, foram transferidos 0,5 mL da mistura de reação para tubos de ensaio contendo 0,5 mL do reagente DNS que foram levados ao banho termostatizado a 100 °C por 5 min. Por fim, após o resfriamento, aos tubos foram adicionados 4 mL de água destilada e homogeneizados.

As amostras foram lidas em espectrofotômetro (EVEN) a 540 nm. O branco da reação foi preparado adicionando-se 0,5 mL do reagente DNS a uma mistura de 2 mL da solução substrato com 0,25 mL do extrato enzimático obtido no início do processo. O branco analítico foi preparado adicionando-se 0,5 mL do reagente DNS a 2 mL da solução de pectina com 0,25 mL de água destilada. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A determinação da atividade de pectinases do caldo enzimático foi baseada no aumento de açúcar redutor/monômero formado por ação da enzima na pectina cítrica. Uma unidade de atividade enzimática de pectinase corresponde à quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido galacturônico por min, nas condições do processo. Os resultados foram expressos por U/mL e calculados de acordo com a Equação 4.5:

$$\text{Atividade pectinase} \left(\frac{u}{mL} \right) = \frac{(A-B) \times f \times d \times 2,25}{(0,1941 \times 30 \times 0,25)} \quad (4.5)$$

Em que:

A: é a absorbância da amostra;

B: é absorbância do branco da amostra;

f: é o fator de conversão da curva de calibração de ácido galacturônico (mg/mL);

d: é a diluição da amostra; 2,25 é o volume total da mistura reacional (mL);

0,1941: é o fator de conversão de miligramas para μ mol de ácido galacturônico;

30: é o tempo de reação (minutos); E

0,25: é o volume do extrato enzimático na mistura reacional (mL).

4.6 APLICAÇÃO DO CALDO ENZIMÁTICO

4.6.1 Preparo as amostras para o processo de clarificação dos sucos de fruta

Os caldos enzimáticos obtidos em cultivo foram testados na clarificação de suco de maçã comercial (100% suco - sem conservantes) e de suco de caju (polpa – sem conservantes). O suco de caju foi preparado na proporção 1 polpa de 100g:100mL (m/v) de água destilada com auxílio de um agitador magnético e rotação de 1000 rpm. Após o preparo, todas as amostras de suco de maçã e de caju foram acondicionadas em tubos e para cada 6,0 mL de suco foi adicionado 1 mL dos caldos enzimáticos. A diluição dos caldos foi realizada para padronizar a atividade enzimática em todas as condições. O tempo de incubação dos devidos tratamentos

enzimáticos foi de 60 min a 50°C. Após o período de tratamento, as amostras foram resfriadas em banho de gelo para interromper a reação enzimática e filtradas para as posteriores análises.

4.6.2 Determinação da clarificação dos sucos de fruta

O caldo enzimático pectinolítico obtido do processo de produção enzimática com o *Aspergillus* NA01 sp. foi aplicado em suco de caju e suco de maçã comerciais para verificação do potencial de clarificação das pectinases fúngicas. A clarificação dos sucos foi determinada por intensidade de cor, medida em espectrofotômetro, seguindo a metodologia por Sandri (2010). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (modelo EVEN), nos comprimentos de onda de 440 e 520 nm, utilizando como branco a água destilada. O comprimento de onda de 440 nm corresponde à cor amarela decorrente de oxidação de polifenóis; a medida em 520 nm refere-se à cor vermelha, resultante da presença de antocianinas da fruta (TANNER e BRUNNER, 1985 apud REGINATO, 2016).

A intensidade de cor (IC) do suco foi expressa como a soma das absorbâncias a 440nm e 520nm, conforme a Equação 4.6:

$$IC = Abs_{440} + Abs_{520} \quad (4.6)$$

Em que:

IC é a intensidade de cor; Abs_{440} é a absorbância da amostra a 440nm de comprimento de onda;

Abs_{520} é a absorbância da amostra a 520nm de comprimento de onda.

A clarificação, expressa em percentual de clarificação, foi determinada em função da intensidade de cor do suco controle e do suco tratado, conforme descreve a Equação 4.7:

$$Clarificação (\%) = \frac{IC_{suco\ controle} - IC_{suco\ tratado}}{IC_{suco\ controle}} \times 100 \quad (4.7)$$

Em que:

$IC_{suco\ controle}$ – intensidade de cor do suco *in natura*

$IC_{suco\ tratado}$ – intensidade de cor do suco adicionado do caldo enzimático.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS

Os resultados podem ser observados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Caracterização físico-química dos meios de cultivos e para clarificação

Material	Sólidos Solúveis Totais – SST (°Brix)	Açúcar Redutor Total (ART)	pH	[Pectina] (% pectato de cálcio)
Extrato aquoso da algaroba – lote 2018	28,0	210g/L	5,1	NA
Extrato aquoso da algaroba – lote 2023	19,0	180g/L	5,5	NA
Meio – Extrato aquoso da algaroba a 10% (v/v)	3,2	8,5g/L	3,0	0,262
Meio – Extrato aquoso da algaroba a 1% (v/v)	0,1	1,45g/L	4,8	0,784
Suco de maçã	13,1	NA	NA	NA
Suco de caju	6,0	NA	NA	NA

*NA – não analisado Fonte: Dados da pesquisa (2024).

O extrato aquoso da algaroba (lote 2018) apresentou uma quantidade de SST igual a 28 °Brix, isso significa que a solução apresenta carboidratos fermentescíveis suficientes para serem utilizados como substrato em processos de transformação por ação microbiana. A determinação do ART de 210 g/L de açúcares complexos comprova a quantidade de açúcares presentes na amostra em termos de glicose. Nesse mesmo sentido foi determinado o teor de SST e ART no extrato aquoso (lote 2023), 19 °Brix e 180 g/L, respectivamente, considerado fonte significativa de açúcares para o desenvolvimento de microrganismos em processos biotecnológicos. Qualquer substância que contenha açúcar ou outro carboidrato assimilável pelo microrganismo constitui-se em substrato para obtenção de bioproduto de interesse (LIMA *et al.*, 2001).

A partir dos resultados, pode-se observar que houve variação entre os SST e ART nos lotes de 2018 e 2023 do extrato aquoso de algaroba utilizados nos experimentos. A diferenciação pode estar atrelada ao grau de maturação das vagens da algaroba utilizadas para extração do caldo em ambos os lotes, uma vez que foram colhidas em momentos distintos. No processo de extração do caldo, segundo metodologia de Silva *et al.* (2001), antes da prensagem há um processo de embebição das vagens de algaroba para facilitar a retirada dos sólidos solúveis. A depender da hidratação promovida, poderá atingir diferentes concentrações de açúcares presentes no caldo oriundo da extração mecânica. O pH das amostras dos extratos, 5,1

e 5,5, foram similares, constatando um pH ligeiramente ácido ideal para o desenvolvimento dos isolados fúngicos utilizados nos cultivos. Dias *et al.* (2017) realizou a análise físico-química do extrato de algaroba e encontrou valores inferiores aos encontrados nesse estudo em termos de ART, em que seus resultados variaram de 99,08 g/L a 100,43 g/L, SST variando de 22,1 a 23,2. e pH foram similares aos encontrados nesse estudo 5,29 a 5,6, respectivamente.

Nessa perspectiva, a eficiência da concentração inicial e o conhecimento sobre o consumo do substrato é determinante para o sucesso da produção enzimática e para determinar os parâmetros cinéticos para otimização mesma (SIMÕES *et al.*, 2020). A literatura relata variações nos níveis de ART dependendo das condições de crescimento da algaroba. Alguns autores, como Besson e Michel (1992) e Nitschke, Ferraz e Pastore (2004) encontraram uma composição de ART nas vagens de algaroba de 3,4 g/100 g e 4,03 g/100 g, respectivamente. Silva (2009) mediram o teor de ART da farinha de algaroba e descobriram que era de 4,6 g/100g, ou 49,7 g/L. Peña-avelino *et al.* (2014), relatou o teor de ART na vagem inteira da algaroba vermelha e branca (*Prosopis laevigata*) em 198 g/L, resultado mais aproximado do encontrado para a espécie utilizada nesse estudo. Os resultados deste estudo demonstraram que existem açúcares fermentáveis suficientes no extrato aquoso de algaroba para que os microrganismos cresçam e produzam enzimas pectinases.

Como as amostras de extrato aquoso de algaroba foram feitas do mesmo conjunto de vagens, seus níveis de pH eram todos similares. Esses resultados estão alinhados com os relatados na literatura que variam de 4,0 a 5,0, obtidos para o extrato bruto de algaroba na produção de enzimas e outros bioprocessos, como o uso do extrato de algaroba como fonte substituta para a produção de celulose bacteriana (NASCIMENTO *et al.*, 2016) e como fonte de carbono para obtenção de celulose bacteriana (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Qualquer processo biológico possui níveis mínimos, ótimos e máximos de pH dependendo de como cada microrganismo se desenvolve. Em geral, as bactérias preferem valores de pH entre 6,5 e 7,0, enquanto os fungos preferem valores de pH mais baixos, entre 4,5 e 5,0 (PERAZZO NETO, 1999).

A quantidade de pectina na forma de pectato de cálcio encontrado neste trabalho foi de 0,262 e 0,784, para os extratos de algaroba a 10% e 1%, respectivamente. Esse valor pode ser comparado ao resultado do teor de substâncias pecticas em algaroba, estimado em 4,9%. Polissacarídeos complexos chamados compostos pécticos são encontrados nas paredes celulares das plantas e servem como aglutinantes. Farmacologicamente, as pectinas funcionam como anti-hipercolesterolêmico e auxiliam na eliminação de metais pesados (IBRAHIM *et al.*, 2013).

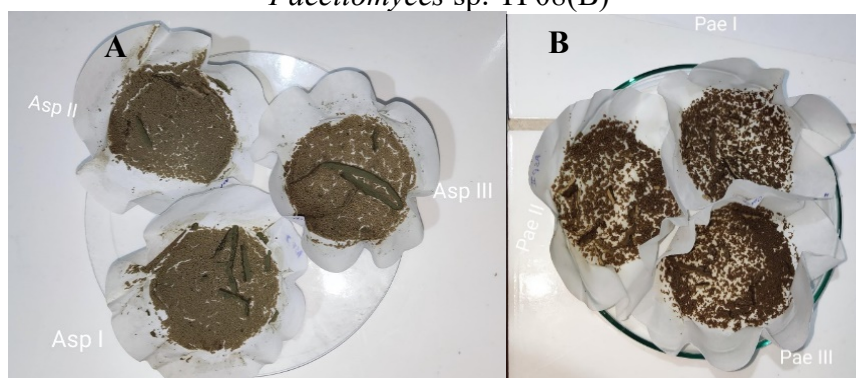
A caracterização dos sucos de frutas cítricas como caju e maçã, em termos de SST, foi essencial para verificar o potencial do caldo enzimático produzido em clarificar esses meios. Assim, o suco de maçã apresentou SST de 16,1 °Brix e o suco de caju 6,0 °Brix. De acordo com a literatura, o teor de SST pode variar a depender do método utilizado na obtenção do suco da fruta (maçã) e da pseudofruta (caju). Em média, o suco de caju pode variar de 8-10 °Brix (SANCHO *et al.*, 2007), o SST encontrado nesse estudo pode estar associado ao método de obtenção do suco, pois foi utilizado uma polpa comercial isenta de conservantes e após a diluição em água, realizou-se uma filtração, o que pode ter reduzido o teor de SST. O suco de maçã apresentou um teor de SST de 13,1 °Brix, suco comercial integral sem adição de açúcares e conservantes. De acordo com regulamento técnico o suco de maçã deverá obedecer às características e composição, apresentando uma cor translúcida, aroma próprio, sólido solúvel mínimo de 10,5 °Brix (20 °C) e um máximo de açúcares totais do fruto de 13,5 g/100 g (EMBRAPA, 2020).

5.2 PROCESSO DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

5.2.1 Cultivos para verificação da habilidade dos isolados fúngicos em produzir pectinases

Na Figura 5.1 pode-se observar o aspecto macroscópico da biomassa seca de duas das três espécies utilizadas, e a terceira não foi registrada:

Figura 5.1 – Aspecto macroscópico da biomassa seca de *Aspergillus* sp. NA01(A) e *Paecilomyces* sp. TP08(B)



Fonte: Autor (2024).

De acordo com Gomes *et al.* (2007), a compreensão do crescimento microbiano é fundamental para o desenvolvimento de processos enzimáticos eficientes, uma vez que o aumento da biomassa microbiana pode estar relacionado à produção de enzimas, desde que o

microrganismo seja induzido a produzi-las para hidrolisar os substratos não facilmente assimiláveis. Mudanças no pH e na temperatura do meio de produção podem ter impacto na produção de certas enzimas. Qualquer alteração nesses parâmetros faz com que a morfologia do fungo e a produção de enzimas sejam alteradas (BODADE *et al.*, 2010).

A determinação da quantidade de inóculo é necessária para cada isolado de fungo, sendo crucial para garantir um cultivo adequado. Conforme Kapoor e Beg (2018) mencionam, que a concentração adequada de esporos é um fator determinante na eficiência da produção enzimática.

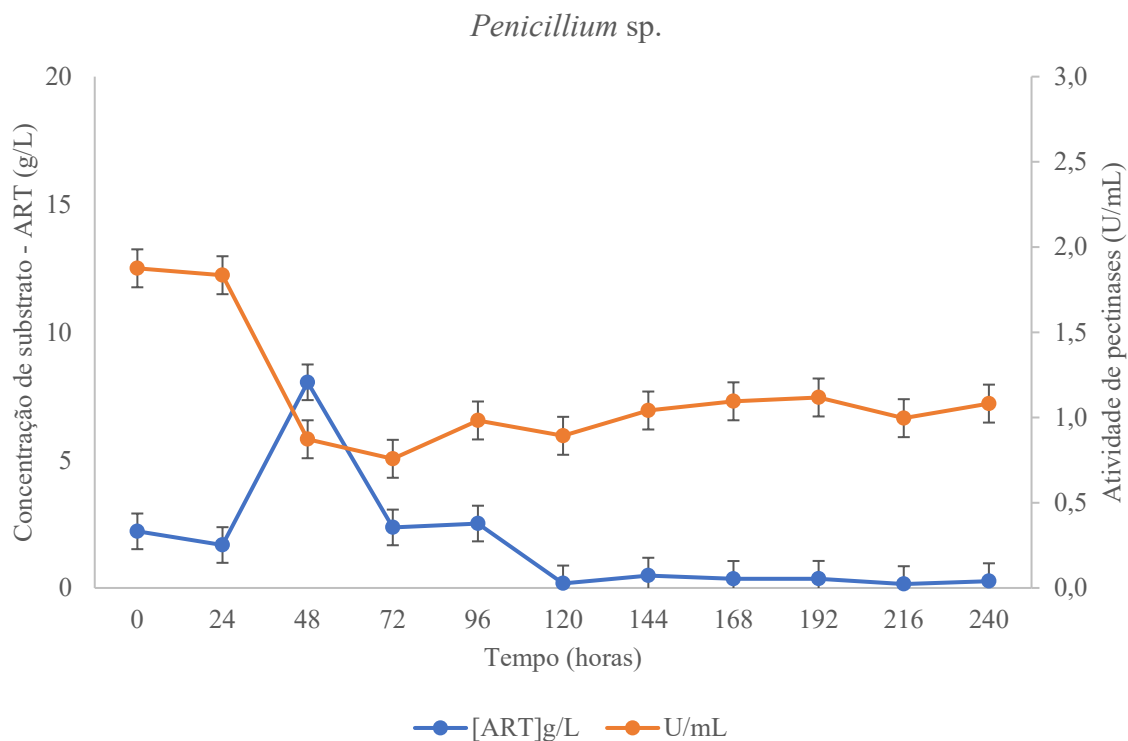
Conforme Sharma *et al.* (2001) destacam, a biomassa microbiana é um indicador confiável do desenvolvimento dos fungos, permitindo avaliar a viabilidade e a produtividade desses microrganismos. Houve mudanças macroscópicas no aspecto do caldo fermentado durante a cultura de 10 dias. Antes do processo, o meio apresentava uma coloração âmbar translúcida; entretanto, após a inoculação, o meio começou a apresentar uma coloração mais turvada devido a proliferação do fungo. Além disso, o aroma do extrato de algaroba foi transformado durante o processo de fermentação.

O consumo de substrato, utilizando o extrato aquoso de algaroba, foi avaliado durante o processo de produção enzimática. De acordo com Simões *et al.* (2020), entender a eficiência do consumo de substrato pelos fungos é essencial para otimizar a produção enzimática. Além disso, a caracterização do complexo enzimático, com ênfase nas atividades enzimáticas pectinolíticas, fornecerá informações detalhadas sobre as enzimas produzidas pelos fungos, como estabilidade frente ao pH, força iônica e temperatura conforme Alves *et al.* (2020) destacam em sua revisão sobre a aplicação industrial de enzimas pectinolíticas a depender de suas características.

Os resultados do cultivo com o isolado *Penicillium* sp. em meio extrato de aquoso da algaroba a 10% (v/v) durante 240 h podem ser vistos na Figura 5.2. A concentração inicial de substrato, demonstrada pela determinação dos açúcares redutores totais (ART), foi de 8,04 g/L. O consumo máximo do substrato foi constatado entre 48 h e 120 h de cultivo. A literatura relata variações nos níveis totais de redução de açúcar dependendo das condições de crescimento da planta. Alguns autores descobriram que a composição de açúcares redutores no extrato aquoso de algaroba variou de 99,08 g/L a 100,43 g/L (DIAS *et al.*, 2017). Nas vagens de algaroba foram relatados valores de 198 g/L, respectivamente (PEÑA-AVELINO *et al.*, 2014). Silva (2009) mediram o teor de açúcar redutor da farinha de algaroba e descobriram que era de 49,7 g/L. Esses resultados indicam que existem açúcares fermentáveis suficientes no extrato aquoso

de algaroba para o crescimento de microrganismos e que a produção de pectinases é possível quando se utilizou o *Penicillium* sp..

Figura 5.2 - Produção de pectinases utilizando o isolado *Penicillium* sp.



Fonte: Autor (2024)

A produção de pectinases por *Penicillium* sp. utilizando outros substratos já foi relatada anteriormente. Banu *et al.* (2010), investigou 10 isolados de resíduos para a produção de enzimas pectinolíticas quando cultivados em meio sólido contendo pectina. Zonas de depuração foram utilizadas para selecionar *Penicillium chrysogenum* e fermentação submersa foi utilizada para produzir a enzima pectinase. Utilizando sacarose e persulfato de amônio como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, *Penicillium chrysogenum* produziu mais enzimas em pH 6,5 e 35 °C. Os resultados desse estudo indicaram que a pectinase de *P. chrysogenum* foi termoestável a 40 °C e teve sua atividade máxima a 50 °C e pH 6,5, sendo indicado que a mesma poderia ser aplicada para extração e clarificação de sucos, dentre outras aplicações industriais, pelos autores. No entanto, os mesmos não realizaram testes para comprovar essa atividade.

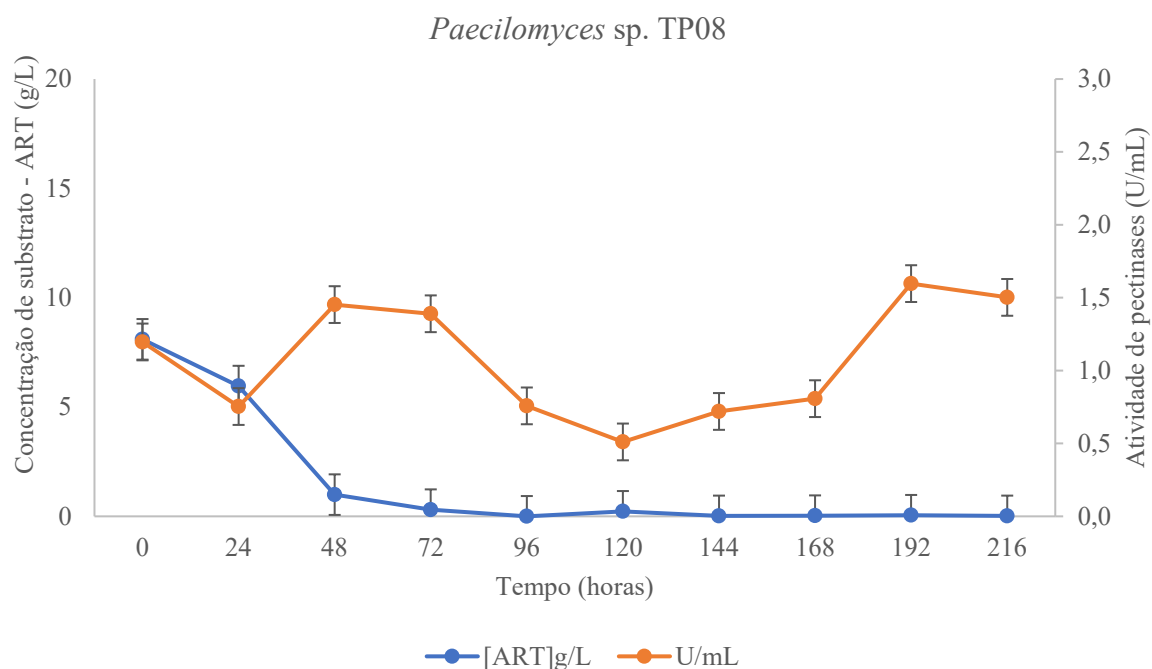
No estudo de Sudeep *et al.* (2020), teve como objetivo separar, filtrar e descrever a pectinase de fungos que foram isolados de diferentes amostras de solo e avaliar seu uso na clarificação do suco. Para isolar e rastrear cepas de fungos, o ágar batata dextrose (ABD)

contendo 1% de citropectina foi utilizado como método primário e a enzima foi gerada através da fermentação em estado submerso (FES). Apenas quatro estirpes, de 14, exibiram o nível mais elevado de atividade pectinolítica e *Aspergillus* spp. Gm, uma das quatro cepas, foi a que produziu o maior número de enzimas quando cultivada por 48 h a 1% de concentração de substrato e 30 °C.

Otimizando a produção de pectinase de resíduos de casca de laranja por *Penicillium chrysogenum*, Ahmed e Rahman (2021) indicaram que as cepas *Aspergillus terreus* MN901491 e *A. oryzae* MN894021 são capazes de produzir a enzima pectinase. No entanto, *Penicillium chrysogenum* MF318506 apresentou a maior atividade de pectinase (0,214 U/ml) no meio recomendado a 30 °C a 150 rpm, em 6 dias. Diferentes resíduos agrícolas (casca de laranja, casca de banana, casca de batata, casca de romã, farelo de trigo e farelo de arroz) foram selecionados, mas a atividade máxima de pectinase de 0,48U/ml foi obtida da casca de laranja.

Buscando determinar as atividades de pectinases de alguns fungos selecionados em resíduos agrícolas, Ametefe *et al.* (2022) identificou que os fungos (*Penicillium* sp. e *Aspergillus niger*) desenvolveram pectinases mais ativas que a levedura *Pichia kudriavzevii* F2-T429-5. Quando comparada ao farelo de trigo, casca de banana, espigas de milho, cascas de frutas e folhas de *Thaumatococcus daniellii* (planta de oração doce), a casca de laranja produziu pectinase com atividade considerável. No estudo sobre a atividade pectinase de frutos de morango, a presença de *Penicillium citrinum* esteve entre as mais frequentes, de acordo com o estudo de Hussein *et al.* (2020), contribuindo, assim, para a produção de pectinases a partir desse resíduo.

A produção de pectinases com o isolado *Paecilomyces* sp. TP08. em meio extrato de aquoso da algaroba a 10% (v/v) durante 240 horas pode ser vista na Figura 5.3.

Figura 5.3 - Produção de pectinases utilizando o isolado *Paecilomyces* sp. TP08.

Fonte: Autor (2024)

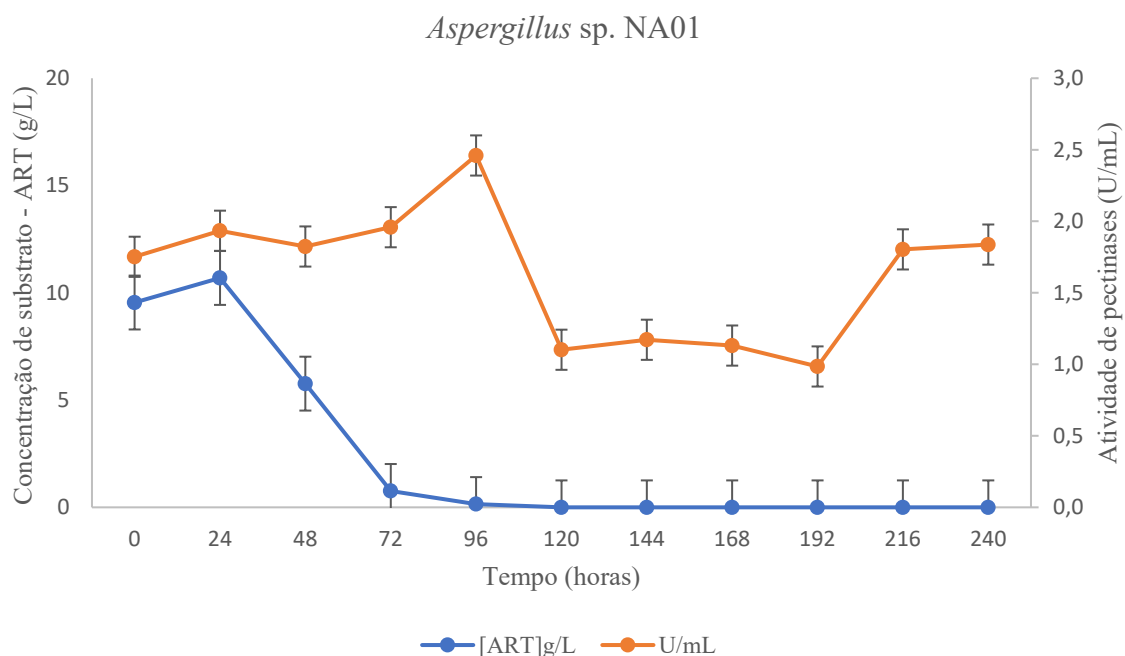
A concentração inicial de substrato, demonstrada pela determinação dos açúcares redutores totais (ART), foi de 8,10g/L. O consumo máximo do substrato foi constatado apenas 72h de cultivo, esse consumo proporcionou um crescimento de biomassa de 2,39 g/L do isolado e uma produção enzimática máxima de 1,60 U.mL⁻¹ de atividade pectinolítica. O bagaço de algaroba, um subproduto da exploração de seus frutos, é composto por materiais celulósicos e hemicelulósicos, que podem ser convertidos em nutrientes pelos microrganismos produtores de enzimas (MOHARRAM, ZOHRI e HUSSEIN, 2021).

O estudo de Patil *et al.* (2012) revelou que um isolado do solo não rizosférico não tratado de áreas de processamento de frutas e resíduos industriais, produzia uma quantidade notável de exopoligalacturonase. Utilizando a análise da sequência do gene 18S rRNA e características morfológicas, o isolado foi identificado como *Paecilomyces variotii*. A exopoligalacturonase purificada apresentou atividade específica de 98,49 U/mg de proteína em pH 6,0 e 30 °C sob condições parcialmente otimizadas. Entre 10 e 30 °C, a enzima era relativamente estável e, à medida que a temperatura subia, também aumentava a atividade da enzima. O estudo ainda revelou que houve atividade enzimática da pectina esterase e pectina liase em menores atividades para esse substrato. Amostras de suco de fruta apresentaram diminuição significativa da viscosidade com a adição de enzima purificada.

Um tratamento de baixa severidade com menor concentração de biomassa e condições de cultivo mais amenas foi considerado ideal para a produção de pectinases devido à alta e rápida indução destas enzimas pelo licor resultante, com uma atividade enzimática observada de 2,11 U/ml, um 11% de redução no teor de lignina total e solubilização de 71% da porção celulósica e hemicelulósica. Este estudo avaliou o potencial de produção de enzimas holocelulolíticas induzidas por *Paecilomyces formosus* utilizando resíduos agroindustriais de café como substrato (ANDRADE *et al.*, 2023).

Por fim, para a produção de pectinases com o isolado *Aspergillus* NA01 sp. em meio extrato de aquoso da algaroba a 10% (v/v) durante 240 h, os resultados podem ser vistos na Figura 5.4.

Figura 5.4 - Produção de pectinases utilizando o isolado *Aspergillus* NA01 sp.



Fonte: Autor (2024)

A concentração inicial de substrato, demonstrada pela determinação dos açúcares redutores totais (ART), foi de 9,55g/L para o cultivo com *Aspergillus* sp NA01. O consumo máximo do substrato foi constatado também com 72 h de cultivo, assim como no cultivo do *Paecilomyces* sp TP08, a biomassa fúngica ao final do cultivo foi de 2,43 g/L do isolado e uma produção enzimática máxima de 2,46 U/mL de atividade pectinolítica.

Ademais, Li *et al.* (2020) também utilizou *Aspergillus niger* para produzir pectinase e α -galactosidase em um substrato de casca de soja, considerando variáveis como pH e

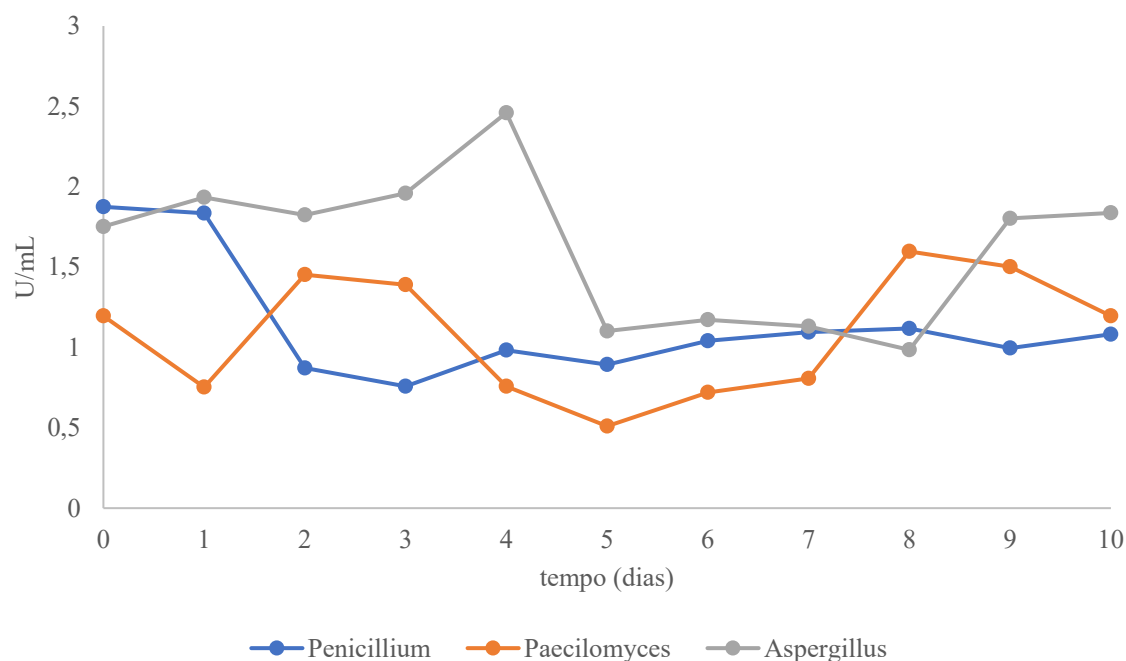
temperatura, mostrando que temperaturas de 20 °C, 25 °C e 30 °C afetam o crescimento celular em sacarose com uma energia de ativação da lei de Arrhenius de 28,7 kcal/mol e que o pH deve ser mantido acima de 2,6 para evitar a limitação na produção de pectinase e, no estágio posterior de limitação do substrato, mantido abaixo de 5,5 para evitar a degradação da pectinase.

Utilizando milho triturado como substrato sólido, Ustok *et al.* (2007) utilizaram *Aspergillus sojae* para criar enzimas poligalacturonase, atingindo uma atividade enzimática máxima de 29 U/g após 5,5 dias. Os pesquisadores utilizaram resíduos de café como substrato para produzir a enzima pectinase e demonstraram que, utilizando espécies de *Aspergillus*, a atividade enzimática máxima ocorre na faixa de temperatura entre 25 e 35 °C (NUÑEZ-PEREZ *et al.*, 2022).

No estudo de Ajayi *et al.* (2020), o rendimento de pectina das cascas de abacaxi foi de 24,8% após 1h de extração, indicando que *A. niger* utilizou a pectina das cascas de abacaxi para produzir pectinase. A temperatura, pH e concentração de substrato ideais foram 40 °C, 5,0 e 1%, respectivamente. Após 5 min a 90°C, a enzima ficou totalmente inativa e superou a pectinase comercial na extração do óleo de coco. É conhecido que alguns fatores como valor de pH, temperatura de incubação, períodos de incubação, fonte de carbono, fonte de nitrogênio e sais minerais do isolado *Aspergillus* sp F9 alteram a produção de pectinase (EL-GHOMARY, SHOUKRY e EL-KOTKAT, 2021).

Na Figura 5.5, é possível observar melhor como se deu a produção de pectinases para cada uma das espécies fúngicas e qual apresentou o melhor resultado:

Figura 5.5 - Produção de pectinases, em comparação, nos ensaios com *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp. TP080 e *Aspergillus* sp. NA01



Fonte: Autor (2024)

Em relação à produção de pectinases, os resultados indicam que *Aspergillus* sp. NA01, no quarto dia, apresentou uma produção de 2,460 U/mL. Assim como o rápido consumo dos açúcares, apresentando melhores resultados em relação à produção de pectinases, seguido do *Penicillium* sp. e do *Paecilomyces* sp. TP08, respectivamente, conforme pode ser visto na Figura supracitada. Ou seja, os resultados indicaram que *Aspergillus* sp. NA01, foi o substrato que apresentou os melhores resultados em relação à produção de pectinases, a partir do acompanhamento cinético (proteínas totais) do crescimento do *Aspergillus* sp. NA01 em meio a 1% de extrato aquoso da algaroba.

As maiores zonas de limpeza entre os fungos isolados localmente foram encontradas com *Aspergillus niger* AUMC 4156 (22 mm) e *Paecilomyces variotii* AUMC 4149 (21 mm), que foi principalmente comparável com a atividade pectinolítica da cepa importada *Aspergillus niger* NRRL 337 (23 mm), de acordo com uma avaliação da capacidade das vinte cepas em produzir enzimas pectinase. A pesquisa das condições ambientais e nutricionais que resultaram na maior quantidade de pectinase(s) produzida(s) por essas três cepas revelou que 30°C e 5 dias foram os períodos de incubação ideais para *Aspergillus niger* NRRL 337, *Aspergillus niger* AUMC 4156 e *Paecilomyces variotii* AUMC 4149, respectivamente (RAGAB, FARAG e ALMOWALLAD, 2010).

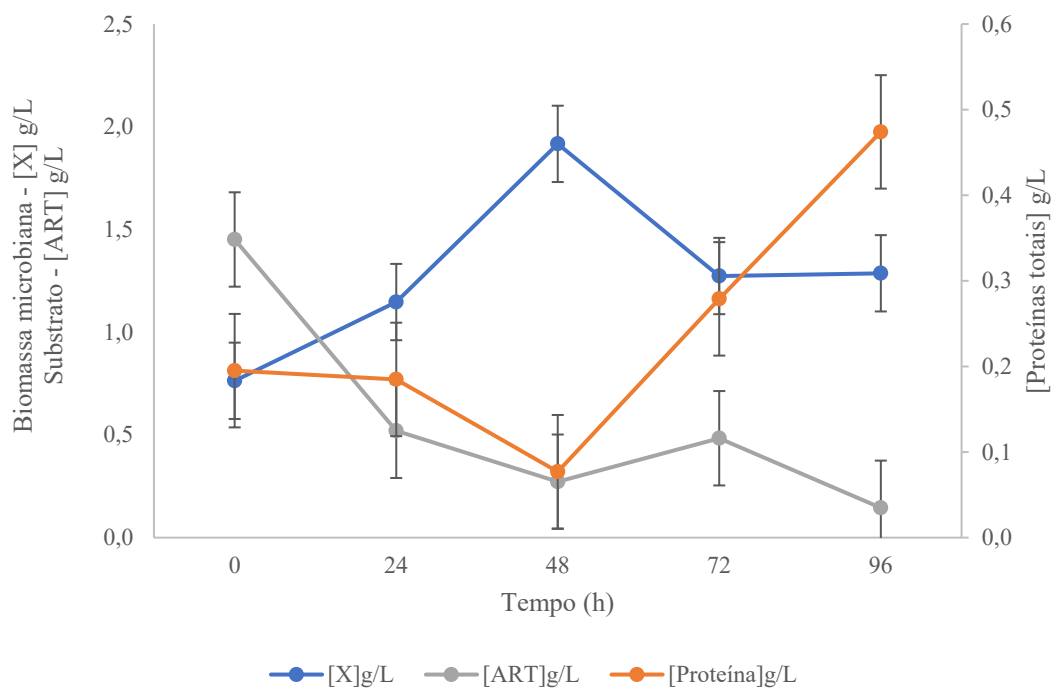
A algaroba (*Prosopis juliflora*) pode ser considerada uma fonte promissora de aproveitamento de baixo custo na produção de enzimas, visto que seus resultados são comparáveis a resultados já encontrados na literatura para outros substratos. A utilização de subprodutos da algaroba como fonte de nutrientes para a produção de enzimas pode ser ainda mais vantajosa quando combinada com técnicas de fermentação em estado sólido. Essa abordagem permite a utilização eficiente de resíduos agroindustriais e oferece vantagens, como menor consumo de água e menor geração de efluentes (SILVA *et al.*, 2019).

5.2.2 Produção de pectinases por *Aspergillus* NA01 sp.

Na Figura 5.6 pode ser observado o acompanhamento cinético do crescimento do *Aspergillus* sp. NA01 em meio a 1% de extrato aquoso da algaroba, em que se observou a concentração máxima de biomassa microbiana de 1,92 g/L em 48 h e proteínas totais próximo de zero. Isso significa que o isolado conseguiu consumir a quantidade de açúcares mais assimiláveis presentes no meio rapidamente nas primeiras 48 h. Para síntese de enzimas hidrolíticas é necessário que o microrganismo tenha disponível uma quantidade mínima de substrato facilmente assimilável para que possa crescer até uma concentração que permita sua sobrevivência. Assim, a quantidade de proteínas totais é menor nesse momento do cultivo, após às 48 h, há uma redução na oferta desses açúcares e o microrganismo é induzido a produzir as enzimas pectinolíticas e outras enzimas para hidrolisar os substratos mais complexos presentes no extrato da algaroba (amido, proteínas e pectina).

Em 72 h, pode-se observar uma diminuição na concentração de biomassa do fungo e um aumento na produção de proteínas totais, inferindo-se que o isolado está sendo induzido a produzir mais enzimas para hidrolisar carboidratos mais complexos e garantir sua sobrevivência no meio. Assim, constatou-se um aumento na produção de proteínas em 96 h de cultivo.

Figura 5.6 - Acompanhamento cinético do crescimento do *Aspergillus* sp. NA01 em meio a 1% de extrato aquoso da algaroba (*P. juliflora*)

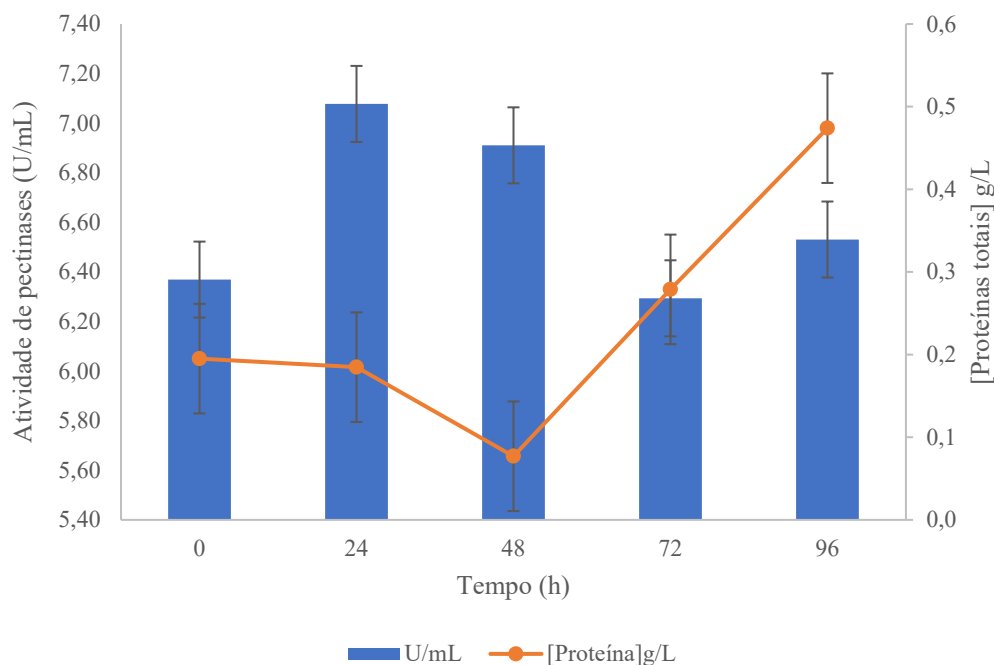


Fonte: Autor (2024)

Observando os valores do gráfico da Figura 5.6, pode-se verificar que a biomassa de *Aspergillus* sp. produzida apresenta conteúdo proteico elevado, tendo em vista que foi observado um conteúdo de 0,47 g/L no estágio final (96 h), o que torna extremamente interessante sua produção. As células de *Aspergillus* sp. NA01 cultivadas no extrato aquoso de algaroba possuem composição semelhante à reportada na literatura (IYAYI, 2004; AUGUSTINE *et al.*, 2006; AHMED *et al.*, 2017).

Além disso, foram analisadas as atividades pectinolítica e proteica, como pode ser observado na Figura 5.7, em que a atividade pectinolítica máxima foi de 7,08 U/mL em 24 h, com um teor de proteínas de 0,18 g/L.

Figura 5.7 - Produção de pectinases e proteínas por *Aspergillus* sp. NA01 em meio a 1% de extrato aquoso da algaroba (*P. juliflora*)



Fonte: Autor (2023)

No estudo de Anisa, Ashwini e Girish (2013), os autores investigaram a atividade pectinolítica de vários *Aspergillus* spp., isolados de resíduos agrícolas, serapilheira, esterco de fazenda e esterco de vaca em meio de ágar pectina, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. Ochraceous* e *Aspergillus* sp. e encontraram valores semelhantes ao encontrado no presente estudo, variando de 5,4 a 10,8U/mL. Outros estudos apresentaram resultados semelhantes, enquadrados dentro da faixa citada (MUNIR *et al.*, 2020; GUIMARÃES *et al.*, 2022; YANG *et al.*, 2023).

5.2.3. Aplicação das pectinases fúngicas de *Aspergillus* NA01 sp. no processo de clarificação de sucos

O suco de maçã clarificado é muito mais popular do que o suco de maçã natural não clarificado devido à preferência do consumidor por um suco de maçã totalmente transparente e brilhante. Após o suco ser engarrafado, não deve ocorrer turbidez e os detritos suspensos devem ser removidos para produzir suco de maçã transparente. O suco que acabou de ser prensado contém sólidos em suspensão que são precipitados propositalmente antes de serem filtrados (ORTEGA-RIVAS, 2019). Ademais, foi relatado que a clarificação, assim como a adição de conservantes e o controle da temperatura durante o armazenamento, são essenciais para a

manutenção do conteúdo nutricional, dos parâmetros físico-químicos e dos atributos sensoriais em sucos de caju (ALUKO, KASSIM e MAKULE, 2023).

Tendo em vista que as pectinases são extensivamente utilizadas no processamento de frutas, principalmente na produção de sucos e vinhos, justifica-se a escolha dessa enzima para a clarificação dessas duas amostras. Essas enzimas são utilizadas na etapa de clarificação, promovendo a hidrólise das moléculas de pectina, diminuindo a viscosidade e a turbidez do suco, ou seja, promovendo a clarificação dos sucos *in natura* (REGINATTO, 2016).

Em função destas aplicações comerciais, a ação das enzimas pectinolíticas foi avaliada no tratamento de suco comercial de fruta de caju e de maçã. Os resultados dos processos de clarificação estão dispostos na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Clarificação de suco de fruta por meio da ação do caldo enzimático pectinolítico

Amostra	Controle		Tratado		IC		Clarificação (%)
	Abs440	Abs520	Abs440	Abs520	controle	tratado	
Suco de maçã	0,259	0,125	0,269	0,114	0,384	0,383	0,26
Suco de caju	1,354	1,468	1,455	1,361	2,822	2,816	0,21

Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Na Tabela 5.2, pode-se observar que houve redução nos valores de absorbância em 440 nm e 520 nm para os sucos tratados em relação ao controle. Essa clarificação foi calculada em 0,26% e 0,21% para os sucos de maçã e caju, respectivamente.

A tanase obtida a partir do *Penicillium rolfsii* CCMB 714 foi relatada como extremamente eficaz na clarificação do suco de maçã, reduzindo a turbidez acima de 70% sem a necessidade de procedimentos de purificação e aumentando a qualidade do produto, reduzindo o tempo de uso e as despesas (ANDRADE *et al.*, 2021).

Utilizando casca de laranja – um processo barato, adaptável e ecologicamente correto – *A. niger* produziu a maior quantidade de pectinase por fermentação submersa. Este método é econômico, flexível e ecologicamente benigno. Em 120 minutos, foi notada uma mudança de cor no suco de maçã, indicando a aplicabilidade da pectinase parcialmente purificada para clarear o suco de maçã e à sua capacidade de quebrar a pectina. Assim, a pectinase mostrou um potencial considerável para a clareza do suco de maçã.

A aplicação de pectinase para clarificação de suco oferece vários benefícios, incluindo melhor produção de suco devido à maior liquefação da polpa, diminuição do teor de açúcar, diminuição da turbidez e viscosidade e aumento do teor de sólidos solúveis totais (RAMADAN,

2018). Além disso, o sabor original da fruta crua é preservado em condições de processamento suaves (CARLI *et al.*, 2019; HE *et al.*, 2018; PAGNONCELI *et al.*, 2019).

A viscosidade do suco foi diminuída pelas pectinases, mas o rendimento, o teor de açúcar e a transmissão de luz aumentaram. Após o tratamento com pectinase, a transmitância luminosa do extrato de laranja, maçã e uva melhorou 19,2, 7,3 e 3,8 vezes, respectivamente (HE *et al.*, 2018). Da mesma forma, observou-se que a viscosidade do suco de romã, maçã e laranja diminuiu 71,43%, 57,5% e 54,2% após tratamento enzimático (POTURCU *et al.*, 2017).

Sudeep *et al.* (2020) utilizou a cepa *Aspergillus* spp. para clarificação de suco de laranja e observou que à medida que a concentração da enzima aumentava, o rendimento do suco, o SST, o valor de absorbância e a % de transmitância também aumentavam. O percentual de clarificação não foi calculado, mas os dados indicam que a absorbância a 540 nm na concentração enzimática de 1% foi de 0,75 para a amostra utilizada, similar a absorbância observada para o suco de caju clarificado nesse estudo.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo teve como hipótese que o extrato de algaroba pode ser utilizado como substrato para a produção de enzimas pectinolíticas usando os fungos filamentosos. Foram, então, utilizados isolados fúngicos como *Penicillium* sp., *Paecilomyces* sp. TP08 e *Aspergillus* sp., para verificar suas habilidades de produzir enzimas microbianas induzidos para composição do extrato aquoso das vagens de algaroba.

A partir da realização dos experimentos e da análise dos resultados, podemos inferir que nossa hipótese foi validada, visto que houve resultados positivos em relação a produção de enzimas pectinolíticas usando os fungos filamentosos e que as mesmas puderam ser utilizadas na clarificação de sucos de fruta.

Um dos objetivos específicos foi verificar dentre os isolados estudados qual teria a maior habilidade de produção de pectinases nas condições de processo utilizadas, em que indicou-se, a partir das análises, que o isolado de *Aspergillus* NA01 sp. foi o que apresentou maior produção de pectinases.

A partir disso, respondeu-se ao segundo objetivo específico, que tratava de verificar o potencial de utilização do extrato aquoso de algaroba na produção de pectinases, em que confirmou-se a produção da mesma em todos os isolados fúngicos analisados. Ademais, foi verificado o potencial de aplicação do caldo enzimático produzido em processo de clarificação de suco de frutas, em que se observou que houve mudanças na absorbância, comparadas a resultados discutidos na literatura.

Portanto, os resultados obtidos foram comparados entre as espécies fúngicas, dando destaque para a espécie fúngica *Aspergillus* NA01 sp. demonstrando que a produção de enzimas pectinolíticas a partir do extrato aquoso da algaroba representa uma abordagem promissora na indústria biotecnológica. Os resultados mostram que o complexo enzimático produzido pelo isolado *Aspergillus* sp NA01, em extrato aquoso de algaroba, pode atuar como agente clarificante em sucos de fruta, como caju e maçã.

REFERÊNCIAS

- ABDELLA, A.; RAMADAN, S.; HAMOUDA, R. A.; SADDIQ, A. A.; ALHAZMI, N. M.; AL-SAMAN, M. A. *Paecilomyces variotii* xylanase production, purification and characterization with antioxidant xylo-oligosaccharides production. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 16468, 2021.
- ABIDIN, K. Y.; NURHAYATI, N.; NANDYAWATI, D.; SABBATHINI, G. Enzymatic degumming using xylanase and pectinase to improve brightness and fineness quality of ramie fiber (*Boehmeria Nivea* l.) as textile raw material. **Jurnal Bioteknologi & Biosains Indonesia (JBBI)**, v. 10, n. 1, p. 76-85, 2023.
- AFZAL, H.; SHAZAD, S.; QAMAR, S.; NISA, U. Morphological identification of *Aspergillus* species from the soil of Larkana District (Sindh, Pakistan). **Asian Journal of Agriculture and Biology**, v. 1, n. 3, p. 105-117, 2013.
- AHMED, N. N. E.; RAHMAN, H. M. M. A. E. Optimizing the production of pectinase of orange peel waste by *Penicillium chrysogenum* MF318506 using response surface methodology in submerged fermentation. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 11, n. 1, p. e3931-e3931, 2021.
- AHMED, S.; MUSTAFA, G.; ARSHAD, M.; RAJOKA, M. I.. Fungal biomass protein production from *Trichoderma harzianum* using rice polishing. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.
- AIZENBERG, V. L.; ZAKHARCHENKO, V. A.; SEMAKOVA, M. V.; SYRCHIN, S. A.; SEDINA, S. A.; KAPICHON, A. P. Selection of pectinesterase overproducing fungal strains for the low degree methoxylated pectin preparation. **Mikrobiolohichnyi Zhurnal**, v. 64, n. 5, p. 18-23, 2002.
- AJAYI, A. A.; LAWAL, B.; SALUBI, A. E.; ONIBOKUN, A. E.; ONIHA, M. I.; AJAYI, O. M. Pectinase production by *Aspergillus niger* using pineapple peel pectin and its application in coconut oil extraction. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2021. p. 012014.
- ALANÑA, A.; GABILONDO, A.; HERNANDO, F.; MORAGUES, M. D.; DOMINGUEZ, J. B.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Pectin lyase production by a *Penicillium italicum* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1612-1616, 1989.
- ALEMÁN-HUERTA, María E.; CASTILLO-CÁZARES, B. A.; MÁRQUEZ-REYES, J. M.; BÁEZ-GONZÁLEZ, J. G.; QUINTERO-ZAPATA, I.; GANDARILLA-PACHECO, F. L.; et al. Muffin-Type Bakery Product Based on Mexican Mesquite (*Prosopis* spp.) Flour: Texture Profile, Acceptability, and Physicochemical Properties. **Foods**, v. 12, n. 19, p. 3587, 2023.
- ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes: a review. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 1, p. 21-28, 1998.
- ALLEM, A. C.; VALLS, J. M. F. Recursos forrageiros nativos do pantanal mato-grossense. 339 p. **EMBRAPA-CENARGEM. Brasília, DF**, 1987.

ALMEIDA, B. J.; BAGALDO, A. R.; SOARES JUNIOR, M. S.; DA SILVA, C. S.; DE ARAÚJO, F. L.; SILVA JUNIOR, J. M.; *et al.* Inclusion *Prosopis juliflora* Pod Meal in Grazing Lambs Diets: Performance, Digestibility, Ingestive Behavior and Nitrogen Balance. **Animals**, v. 12, n. 4, p. 428, 2022.

ALMOWALLAD, S. A.; ALJOB AIR, M. O.; ALKURAIIEEF, A. N.; ALJAHANI, A. H.; ALSUHAIBANI, A. M.; ALSAYADI, M. M. Utilization of agro-industrial orange peel and sugar beet pulp wastes for fungal endo-polygalacturonase production. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 963-969, 2022.

ALUKO, A.; KASSIM, N.; MAKULE, E. Investigating the Optimal Treatment to Improve Cashew Apple Juice Quality and Shelf Life. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 2023, 2023.

ALVES, A. C. de M.; SANTOS, J. C. M. dos; SILVA, J. N. Estudo do Monitoramento das Aplicações Tecnológicas da *Prosopis Juliflora* (Algaroba). **Cadernos de Prospecção**, v. 12, n. 2, p. 374-374, 2019.

ALVES, M. F.; VIEIRA, M. P.; TEIXEIRA, J. M.; MOTA, K. I. A.; CARVALHO, S. A. Produção de enzimas por fungos filamentosos. In: ARAÚJO, Lina Raquel Santos. **Fundamentos e atualidades em tecnologia e inspeção de alimentos** Fortaleza: Editora In Vivo, 2020. 131p.

AMETEFÉ, G. D.; LEMO, A. O.; ORJI, F. A.; LAWAL, A. K.; IWEALA, E. E. J.; CHINEDU, S. N. Pectinase Activities of Selected Fungi Grown on Agrowastes via Solid-state Fermentation. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2022. p. 012003.

ANDRADE, A. S. A.; NETO, N. J. O.; DIAS, E. C.; GERVÁSIO, D. K. L.; LIMA, M. K. L.; DE MELO SANTOS, S. F.; *et al.* Estudo da produção de enzimas pectinolíticas e celulolíticas por fermentação em estado sólido a partir do bagaço de cajá. **Revista Saúde & Ciência**, v. 7, n. 2, p. 457-472, 2018.

ANDRADE, M. C.; ALVES, G. S. C.; FONTES, P. R.; MILLER, R. N. G.; Filho, E. X. F. Hydrothermal Treatment of Coffee Residues for the Production of Pectinases by *Paecilomyces Formosus*. **Waste and Biomass Valorization**, v. 14, n. 7, p. 2375-2388, 2023.

ANDRADE, P. M. L.; BAPTISTA, L.; BEZERRA, C. O.; PERALTA, R. M.; GÓES-NETO, A.; UETANABARO, A. P. T.; COSTA, A. M. D. Immobilization and characterization of tannase from *Penicillium rolfsii* CCMB 714 and its efficiency in apple juice clarification. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, p. 1005-1013, 2021.

ANISA, S. K.; ASHWINI, S.; GIRISH, K. Isolation and screening of *Aspergillus* spp. for pectinolytic activity. **Electronic journal of biology**, v. 9, n. 2, p. 37-41, 2013.

APOSTOLIDI, M. E.; KALANTZI, S.; HATZINIKOLAOU, D. G.; KEKOS, D.; MAMMA, D. Catalytic and thermodynamic properties of an acidic α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii* ATHUM 8891. **3 Biotech**, v. 10, n. 7, p. 311, 2020.

AUGUSTINE, A.; IMELDA, J.; PAULRAJ, R. Biomass estimation of *Aspergillus niger* S, 4 a mangrove fungal isolate and *A. oryzae* NCIM 1212 in solid-state fermentation. **Journal of the Marine Biological Association of India**, v. 48, n. 2, p. 139-146, 2006.

AXELOS, M. A. V.; THIBAUT, J. F. The chemistry of low-methoxyl pectin gelation. **The chemistry and technology of pectin**, v. 6, p. 109-108, 1991.

AZZAZ, H. H.; KHOLIF, A. E.; MURAD, H. A.; EL-BORDENY, N. E.; EBEID, H. M.; HASSAAN, N. A.; ANELE, U. Y. A new pectinase produced from compared with a commercial pectinase enhanced feed digestion, milk production and milk fatty acid profile of Damascus goats fed pectin-rich diet. **Annals of Animal Science**, v. 21, n. 2, p. 639-656, 2021.

BANGORIA, P.; DIVECHA, J.; SHAH, A. R. Production of mannoooligosaccharides producing β -Mannanase by newly isolated *Penicillium aculeatum* APS1 using oil seed residues under solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 34, p. 102023, 2021.

BANGORIA, P.; PATEL, A.; SHAH, A. R. Thermotolerant and protease-resistant GH5 family β -mannanase with CBM1 from *Penicillium aculeatum* APS1: purification and characterization. **3 Biotech**, v. 13, n. 3, p. 107, 2023.

BANU, A. R.; DEVI, M. K.; GNANAPRABHAL, G. R.; PRADEEP, B. V.; PALANISWAMY, M. Production and characterization of pectinase enzyme from *Penicillium chrysogenum*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 4, p. 377-381, 2010.

BECKMAM, K. R. L. **Caracterização físico-química e extração de Pectina da farinha da casca de banana verde tipo Cavendish** (Musa AAA). Monografia do curso de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Tocantins, Campus Palmas, 2019.

BERGEY, D. R.; OROZCO-CARDENAS, M.; MOURA, D. S.; RYAN, C. A. A wound-and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 4, p. 1756-1760, 1999.

BESSON, F.; MICHEL, G. Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis*: evidence for amino acid activating enzymes. **Biotechnology letters**, v. 14, p. 1013-1018, 1992.

BIGNE, F.; PUPPO, M. C.; FERRERO, C. Mesquite (*Prosopis alba*) flour as a novel ingredient for obtaining a “panettone-like” bread. Applicability of part-baking technology. **LWT**, v. 89, p. 666-673, 2018.

BILAL, M.; IQBAL, H. MN. Sustainable bioconversion of food waste into high-value products by immobilized enzymes to meet bio-economy challenges and opportunities—A review. **Food Research International**, v. 123, p. 226-240, 2020.

BINH, C. T.; VAN TUAN, T.; TRAM, T. B.; HA, B. T. V. Determination of protease and chitinase activities from *Paecilomyces variotii* NV01 isolated from Dak Lak pepper soil. **Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering**, v. 61, n. 4, p. 58-63, 2019.

BODADE, R. G.; KHOBRADE, C. N.; ARFEEN, S. Optimization of culture conditions for glucose oxidase production by a *Penicillium chrysogenum* SRT 19 strain. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 1, p. 35-39, 2010.

BONNIN, E.; PELLOUX, J. Pectin degrading enzymes. **Pectin: technological and physiological properties**, p. 37-60, 2020.

BORGES, E. E. L. Algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC.) - características, usos e manejo. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2004.

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**, Volume 1, Fundamentos. 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001, 254 p. II

CAMPELO, C. R.; CAMPELO, C. R.; SANTOS, J. M.; CRUZ FILHO, J. Pod Spot and Seed Blight: A New Disease of Mesquite Caused by *Macrophomina phaseovma*. **Journal of Phytopathology**, v. 127, n. 2, p. 173-176, 1989.

CÁNOVAS, D.; MARCOS, A. T.; GACEK, A.; RAMOS, M. S.; GUTIÉRREZ, G.; REYES-DOMÍNGUEZ, Y.; STRAUSS, J. The histone acetyltransferase GcnE (GCN5) plays a central role in the regulation of *Aspergillus* asexual development. **Genetics**, v. 197, n. 4, p. 1175-1189, 2014.

CANTERI, Maria HG.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. D. P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, p. 149-157, 2012.

CARLI, S.; MELEIRO, L. P.; WARD, R. J. Biochemical and kinetic characterization of the recombinant GH28 *Stereum purpureum* endopolygalacturonase and its biotechnological application. **International journal of biological macromolecules**, v. 137, p. 469-474, 2019.

CARVALHO, A.; DE LUCA, A.; BOZZA, S.; CUNHA, C.; D'ANGELO, C.; MORETTI, S.; *et al.* TLR3 essentially promotes protective class I-restricted memory CD8⁺ T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* in hematopoietic transplanted patients. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 119, n. 4, p. 967-977, 2012.

CHEN, X.; XU, Y.; WU, J.; YU, Y.; ZOU, B.; LI, L. Effects of Pectinase Pre-Treatment on the Physicochemical Properties, Bioactive Compounds, and Volatile Components of Juices from Different Cultivars of Guava. **Foods**, v. 12, n. 2, p. 330, 2023.

CONSTANTIN, M.; RAUT, I.; GURBAN, A. M.; DONI, M.; RADU, N.; ALEXANDRESCU, E.; JECU, L. Exploring the Potential Applications of *Paecilomyces lilacinus* 112. **Applied Sciences**, v. 12, n. 15, p. 7572, 2022.

DAKHIL, M. A.; EL-KEBLAWY, A.; EL-SHEIKH, M. A.; HALMY, M. W. A.; KSIKSI, T.; HASSAN, W. A. Global invasion risk assessment of *Prosopis juliflora* at biome level: Does soil matter? **Biology**, v. 10, n. 3, p. 203, 2021.

DAMASCENO, G. A. de B.; SOUTO, A. L.; DA SILVA, I. B.; ROQUE, A. D. A.; FERRARI, M.; GIORDANI, R. B. *Prosopis juliflora*: phytochemical, toxicological, and allelochemicals. In: **Co-evolution of secondary metabolites**, p. 521-541, 2020.

DANTAS, E. F. **Simbiose entre algaroba e rizóbios naturalmente estabelecidos em solos de Pernambuco**: potencial de aporte de nitrogênio. 2022. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

DAS, A.; RAY, M.; ADHIKARI, S. Enzyme technology on value addition of fruits and vegetables juice processing. In: **Value-Addition in Beverages through Enzyme Technology**. Academic Press, 2023. p. 51-62.

DAVE, P. N.; BHANDARI, J. *Prosopis julifera*: A review. **International Journal of Chemical Studies**, v. 1, n. 3, p. 181-196, 2013.

DEL VALLE, F. R.; ESCOBEDO, M.; MUNOZ, M. J.; ORTEGA, R.; BOURGES, H. Chemical and nutritional studies on mesquite beans (*Prosopis juliflora*). **Journal of Food Science**, v. 48, n. 3, p. 914-919, 1983.

DIAS, E. C.; ANDRADE, A. S. A.de.; SILVA, A. L. e S.; DIAS, C. H. A.; SOUSA, A. C. B. de.; ALMEIDA, A. F. de. Utilização do extrato aquoso da algaroba na produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. **Anais... II Simpósio de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Semiárido** (ISSN: 2359-1153). Sumé-PB, 29 de novembro a 01 de dezembro, 2017.

DOMEMANN, G. M. **Comparação de Métodos para Determinação de Açúcares Redutores e não- redutores**. 2016. 47p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

EL ENSHASY, H. A.; ELSAYED, E. A.; SUHAIMI, N.; MALEK, R. A.; ESAWY, M. Bioprocess optimization for pectinase production using *Aspergillus niger* in a submerged cultivation system. **BMC biotechnology**, v. 18, p. 1-13, 2018.

EL-GHOMARY, A. E.; SHOUKRY, A. A.; EL-KOTKAT, M. B. Productivity of pectinase enzymes by *Aspergillus* sp. isolated from Egyptian soil. **Al-Azhar Journal of Agricultural Research**, v. 46, n. 2, p. 79-87, 2021.

ELLSWORTH, S. W.; CRANDALL, P. G.; LINGBECK, J. M.; O'BRYAN, C. A. Perspective on the control of invasive mesquite trees and possible alternative uses. **iForest-Biogeosciences and Forestry**, v. 11, n. 5, p. 577, 2018.

ETXEBESTE, O.; ESPESO, E. A. *Aspergillus nidulans* in the post-genomic era: a top-model filamentous fungus for the study of signaling and homeostasis mechanisms. **International Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 5-22, 2020.

FABIANI, G. L.; SILVINA, G.; COSTA, K.; ROSAS, D.; SARA, M. Applying an Ingredient with Antioxidant Activity and its Effect on the Nutritional and Sensory Quality of Cookies. **Journal of Food Chemistry and Nanotechnology**, v. 6, n. 3, p. 129-137, 2020.

FIGUEIREDO, M. P. de; CRUZ, P. G., COSTA, S. S.; RODRIGUES, C. S.; PEREIRA, L. G. R.; FERREIRA, J. Q.; et al. Fracionamento dos carboidratos e componentes nitrogenados do farelo e diferentes partes integrantes da vagem de algaroba ("*Prosopis juliflora*"(Swartz) dc). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 1, 2007.

FIGUEIREDO, R. M. F. **Caracterização de Sementes de Algaroba (*Prosopis juliflora*, SW) do Litoral Norte do Estado de Sergipe**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2009.

FODA, Doaa S.; NOUR, S. A.; ISMAIL, S. A.; HASHEM, A. M. Safety evaluation of β -mannanase enzyme extracted from the mutant pathogenic fungal strain *Penicillium citrinum* in female wistar rats. **International Journal of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 74-81, 2022.

FOGERATY, W. M.; KELLY, C. T. Pectinesterase and pectinesterase inhibitors in the control of plant cell wall stability. **Annual Review of Phytopathology**, v. 21, p. 181-207, 1983.

FONSECA, S.; RADHAKRISHNAN, D.; PRASAD, K.; CHINI, A. Fungal production and manipulation of plant hormones. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 253-267, 2018.

GAMS, W.; CHRISTENSEN, M.; ONIONS, A. H.; PITT, J. I.; SAMSON, R. A. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. In: **Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics**. Boston, MA: Springer US, 1985. p. 55-62.

GARCIA, D.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Modeling kinetics of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize-based medium and maize grain. **International journal of food microbiology**, v. 162, n. 2, p. 182-189, 2013.

GEISER, D. M.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 59, n. 1, p. 1-10, 2007.

GHOLAMI-SHABANI, M.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; JAMZIVAR, F.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Prospective application of *Aspergillus* Species: Focus on enzyme production strategies, advances and challenges. **IntechOpen**, 2021. DOI: 10.5772/intechopen.101726.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. D. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova**, v. 30, p. 136-145, 2007.

GONZALES-BARRON, U.; DIJKSHOORN, R.; MALONCY, M.; FINIMUNDY, T.; CALHELHA, R. C.; PEREIRA, C.; *et al.* Nutritive and bioactive properties of mesquite (*Prosopis pallida*) flour and its technological performance in breadmaking. **Foods**, v. 9, n. 5, p. 597, 2020.

GOSWAMI, D. Eccentricity in the behavior of *Penicillium* spp. as phytopathogen and phytoaugmentor. **Beneficial Microbes for Sustainable Agriculture and Environmental Management**, p. 68, 2020.

GUIMARÃES, N. C. de A.; GLIENKE, N. N.; GALEANO, R. M. S.; 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, p. 102233, 2022.

GUMMADI, S. N.; MANOJ, N.; KUMAR, D. Sunil. Structural and biochemical properties of pectinases. **Industrial enzymes: structure, function and applications**, p. 99-115, 2007.

GUNJAL, A. B.; PATIL, N. N.; SHINDE, S. S.; GUNJAL, A. B.; PATIL, N. N.; SHINDE, S. S. Pectinase in Degradation of Lignocellulosic Wastes. **Enzymes in Degradation of the Lignocellulosic Wastes**, p. 71-103, 2020.

HAAS, K. T.; WIGHTMAN, R.; MEYEROWITZ, E. M.; PEAUCELLE, A. Pectin homogalacturonan nanofilament expansion drives morphogenesis in plant epidermal cells. **Science**, v. 367, n. 6481, p. 1003-1007, 2020.

HADFIELD, K. A.; BENNETT, A. B. Polygalacturonases: many genes in search of a function. **Plant physiology**, v. 117, n. 2, p. 337-343, 1998.

HAILE, S.; AYELE, A. Pectinase from microorganisms and its industrial applications. **The Scientific World Journal**, v. 2022, 2022.

HAMLYN, P. F.; WALES, D. S.; SAGAR, B. F. Extracellular enzymes of *Penicillium*. In: **Penicillium and Acremonium**. Boston, MA: Springer US, 1987. p. 245-284.

HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C.; LÜBECK, P. S.; ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327-1341, 2015.

HE, Y.; PAN, L.; WANG, B. Efficient over-expression and application of high-performance pectin lyase by screening *Aspergillus niger* pectin lyase gene family. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 662-669, 2018.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; BERGMANN, C. W.; LOERA-CORRAL, O.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; HUERTA-OCHOA, S. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2001-2006, 2011.

HOLMQUIST-DONQUIS, A.; REY, J. R. de. Caracterización de los frutos y harina de algarroba (*Prosopis juliflora*) en la alimentación de bovinos. **Veterinaria Argentina**, v. 14, n. 133, p. 660-672, 1997.

HUGHES, C. E.; RINGELBERG, J. J.; LEWIS, G. P.; CATALANO, S. A. Disintegration of the genus *Prosopis* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, mimosoid clade). **PhytoKeys**, v. 205, p. 147, 2022.

HUSSAIN, A.; SHRIVASTAV, A.; JAIN, S. K.; BAGHEL, R. K.; RANI, S.; AGRAWAL, M. K. Cellulolytic Enzymatic Activity of Soft Rot Filamentous Fungi *Paecilomyces variotii*. **Advances in BioResearch**, v. 3, n. 3, 2012.

HUSSEIN, M. A.; EL-SAID, A. HM; YASSEIN, A. S. Mycobiota associated with strawberry fruits, their mycotoxin potential and pectinase activity. **Mycology**, v. 11, n. 2, p. 158-166, 2020.

IBRAHIM, M.; NADIR, M.; ALI, A.; AHMAD, V. U.; RASHEED, M. Phytochemical analyses of *Prosopis juliflora* Swartz DC. **Pak. J. Bot**, v. 45, n. 6, p. 2101-2104, 2013.

IYAYI, E. A. Changes in the cellulose, sugar and crude protein contents of agro-industrial by-products fermented with *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 186-188, 2004.

JARDIM, L. A. de S.; MENDES, M. L. M. Caracterização físico-química de farinha de algarroba e sua utilização na panificação. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, p. e70111133246-e70111133246, 2022.

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

KAPOOR, M.; NAIR, L. M.; KUHAD, R. C. Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 88-97, 2008.

KAPUR, M.; BEG, Q. K. Cold-active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, 2008.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource technology**, v. 77, n. 3, p. 215-227, 2001.

KETIPALLY, R.; RAM, M. R. Optimization of pectinase production by *Aspergillus oryzae* RR 103. **Current agriculture research journal**, v. 6, n. 1, p. 37, 2018.

KHATTAB, A. M. The microbial degradation for pectin. **In Pectins: The New-Old Polysaccharides**, p. 83-108, 2022.

KIMATA, K.; OIKE, Y.; ITO, K.; KARASAWA, K.; SUZUKI, S. The occurrence of low buoyant density proteoglycans in embryonic chick cartilage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 85, n. 4, p. 1431-1439, 1978.

KIRAN, E. U.; TRZCINSKI, A. P.; NG, W. J.; LIU, Y. Enzyme production from food wastes using a biorefinery concept. **Waste and Biomass Valorization**, v. 5, p. 903-917, 2014.

KORUS, J.; WITCZAK, M.; KORUS, A.; JUSZCZAK, L. Mesquite (*Prosopis* L.) as a functional ingredient in gluten-free dough and bread. **LWT**, v. 168, p. 113957, 2022.

LADJAMA, A.; CHARDON-LORIAUX, I.; FOGLIETTI, M. J. On the pectolytic activity of two *Streptomyces* strains. **FEMS microbiology letters**, v. 79, n. 2-3, p. 279-284, 1991.

LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Recombinant expression of heterologous pectinases in *Pichia pastoris*. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 493-520, 2000.

LEITE, P.; SOUSA, D.; FERNANDES, H.; FERREIRA, M.; COSTA, A. R.; FILIPE, D. Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 27, p. 100407, 2021.

LI, H.; DOU, M.; WANG, X.; GUO, N.; KOU, P.; JIAO, J.; FU, Y. Optimization of cellulase production by a novel endophytic fungus *Penicillium oxalicum* R4 isolated from *Taxus cuspidata*. **Sustainability**, v. 13, n. 11, p. 6006, 2021.

LI, Q.; RAY, C. S.; CALLOW, N. V.; LOMAN, A. A.; ISLAM, S. M.; JU, L. K. *Aspergillus niger* production of pectinase and α -galactosidase for enzymatic soy processing. **Enzyme and microbial technology**, v. 134, p. 109476, 2020.

LI, W.; JIANG, Y.; HU, C.; LIU, G.; LI, Y.; WANG, S. Identification, pathogenic mechanism and control of *Rhizopus oryzae* causing postharvest fruit rot in pumpkin. **Postharvest Biology and Technology**, v. 204, p. 112460, 2023.

LIPPUNER, Veronica; CYERT, Martha S.; GASSER, Charles S. Two classes of plant cDNA clones differentially complement yeast calcineurin mutants and increase salt tolerance of wild-type yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 22, p. 12859-12866, 1996.

LIU, S.; WANG, H.; SU, M.; HWANG, G. J.; HONG, J.; JUNG, J. H. New metabolites from the sponge-derived fungus *Aspergillus sydowii* J05B-7F-4. **Natural product research**, v. 31, n. 14, p. 1682-1686, 2017.

LIU, X. Z.; WANG, Q. M.; GÖKER, M.; GROENEWALD, M.; KACHALKIN, A. V.; LUMBSCH, H. T. Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. **Studies in Mycology**, 81, 85-147, 2015.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. In: **Biotechnology of microbial enzymes**. Academic Press, 2023. p. 405-444.

LÓPEZ-VILLAVICENCIO, M.; AGUILETA, G.; GIRAUD, T.; DE VIENNE, D. M.; LACOSTE, S.; COULOUX, A.; DUPONT, J. Sex in *Penicillium*: Combined phylogenetic and experimental approaches. **Fungal genetics and biology**, v. 47, n. 8, p. 693-706, 2010.

MACEDO, K. M.; AZEVEDO, R. A.; DA SILVA, E. G. P.; DAS CHAGAS, T. P.; SALAY, L. C.; UETANABARO, A. P. T.; et al. Saccharification of Agricultural Wastes and Clarification of Orange Juice by *Penicillium rolsfii* CCMB 714 Pectinase. **Fermentation**, v. 9, n. 10, p. 917, 2023.

MADEIRA JR, J. V.; CONTESINI, F. J.; CALZADO, F.; RUBIO, M. V.; ZUBIETA, M. P.; LOPES, D. B.; DE MELO, R. R. Agro-industrial residues and microbial enzymes: an overview on the eco-friendly bioconversion into high value-added products. **Biotechnology of microbial enzymes**, p. 475-511, 2017.

MANGRIO, G. S.; PIRAH, S.; MANGRIO, N.; ASGHAR, A.; SIMAIR, A.; BUGHIO, F. A. Bioprocess optimization for pectinase production in a submerged cultivation system using various filamentous fungi. **Pakistan Journal of Biotechnology**, v. 20, n. 02, p. 347-355, 2023.

MATTA, D.; NANDA, H.; MAHALINGAM, G.. Phytopharmaceutical potentials of *Prosopis laevigata*, *Symplocos cochinchinensis* and *Nymphaea alba*: a review. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, p. 63-68, 2017.

MENDES, B. V. Prosopis in Brazil. In: The current state of knowledge on *Prosopis juliflora*. Habit, M.A. and Saavedra, J.C. (Eds). FAO, Plant Production and Protection Division, Rome, 1988.

MENEZES, D. B.; DE ANDRADE, L. R. M.; VILAR, D.; VEGA-BAUDRIT, J. R.; TORRES, N. H.; BILAL, M. Synthesis of Industrial Enzymes from Lignocellulosic Fractions. In: **Enzymes for Pollutant Degradation**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. p. 19-48.

MEROPS database. 2023. Disponível em: <http://merops.sanger.ac.uk/>. Acesso em: 23 nov. 2023.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

- MK, M.; KHAN, A., K, K., ABDULJABBAR, A. H., SYAFRI, E.; *et al.* Development and Characterization of Sustainable Bioplastic Films Using Cellulose Extracted from *Prosopis juliflora*. **Journal of Natural Fibers**, v. 20, n. 2, p. 2231271, 2023.
- MOHARRAM, A. M.; ZOHRI, A. N. A.; HUSSEIN, D. A. Cellulase and xylanase production by sugarcane bagasse mycobiota. **Egyptian Sugar Journal**, v. 16, p. 41-76, 2021.
- MOHNEN, D. Pectin structure and biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 3, p. 266-277, 2008.
- MOKRANI, S.; NABTI, E. H. Recent status in production, biotechnological applications, commercial aspects, and future prospects of microbial enzymes: A comprehensive review. **Int J Agric Sc Food Technol**, v. 10, n. 1, p. 006-020, 2024.
- MORENO-GAVÍRA, A.; HUERTAS, V.; DIÁNEZ, F.; SÁNCHEZ-MONTESINOS, B.; SANTOS, M. *Paecilomyces* and its importance in the biological control of agricultural pests and diseases. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1746, 2020.
- MUKESH KUMAR, D. J.; GOWTHAMAN, M. K.; NAGARAJAN, V. Pectinase: An overview. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. S6, n. 001, 2012.
- MUNIR, M.; ABDULLAH, R.; HAQ, I. U.; KALEEM, A.; IQTEDAR, M.; ASHRAF, S. Purification, characterization, kinetics and thermodynamic analysis of polygalacturonase from *Aspergillus tamaritii* for industrial applications. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 19, n. Sup. 1, p. 293-304, 2020.
- MUNIZ, M. B. Avaliação do processo de enriquecimento nutricional da vagem da algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) DC). **XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM 2009)**, p. 1-6, 2009.
- MUSSATTO, S. I.; BALLESTEROS, L. F.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A. Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. **Industrial waste**, v. 274, 2012.
- NASCIMENTO, E. S. D.; LIMA, H. L. S.; ARAÚJO BARROSO, M. K. D.; BRÍGIDA, A. I. S.; ANDRADE, F. K.; FÁTIMA BORGES, M. D. Mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw.)) extract is an alternative nutrient source for bacterial cellulose production. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 10, n. 1, p. 63-70, 2016.
- NASCIMENTO, E. S.; LIMA, H., Andrade, F. K.; BRIGIDA, A.; ROSA, M. D. F.; BORGES, M. D. F. Extrato de algaroba como fonte de carbono para obtenção de celulose bacteriana. *In: Simpósio Nacional De Bioprocessos*, 19., 2013, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu, 2013. p. 1-4.
- NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 81-85, 2004.
- NJOKWENI, S. G.; WEIMER, P. J.; WARBURG, L.; BOTES, M.; VAN ZYL, W. H. Valorisation of the invasive species, *Prosopis juliflora*, using the carboxylate platform to produce volatile fatty acids. **Bioresource technology**, v. 288, p. 121602, 2019.

NÚÑEZ PÉREZ, J.; CHÁVEZ ARIAS, B. S.; DE LA VEGA QUINTERO, J. C.; ZÁRATE BACA, S.; PAIS-CHANFRAU, J. M. Multi-objective statistical optimization of pectinolytic enzymes production by an *Aspergillus* sp. on dehydrated coffee residues in solid-state fermentation. **Fermentation**, v. 8, n. 4, p. 170, 2022.

NÚÑEZ-SERRANO, A.; GARCÍA-REYES, R. B.; SOLÍS-PEREIRA, S.; GARCÍA-GONZÁLEZ, A. Production and immobilization of pectinases from *Penicillium crustosum* in magnetic core-shell nanostructures for juice clarification. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 130268, 2024.

OJEDA-LÓPEZ, M.; CHEN, W.; EAGLE, C. E.; GUTIÉRREZ, G.; JIA, W. L.; SWILAIMAN, S. S. Evolution of asexual and sexual reproduction in the aspergilli. **Studies in mycology**, v. 91, n. 1, p. 37-59, 2018.

ORTEGA-RIVAS, E. Review and advances in apple juice processing. *In: Food Process Design and Evaluation*. Routledge, 2019. p. 27-46.

OTT, C.; TOMASINA, F.; CAMPOLO, N.; BARTESAGHI, S.; MASTROGIOVANNI, M.; LEYVA, A. Decreased proteasomal cleavage at nitrotyrosine sites in proteins and peptides. **Redox Biology**, v. 46, p. 102106, 2021.

PAGNONCELI, J.; RASBOLD, L. M.; ROCHA, G. B.; SILVA, J. L. C.; KADOWAKI, M. K.; SIMÃO, R. D. C. G.; MALLER, A. Biotechnological potential of an exo-polygalacturonase of the new strain *Penicillium janthinellum* VI2R3M: biochemical characterization and clarification of fruit juices. **Journal of applied microbiology**, v. 127, n. 6, p. 1706-1715, 2019.

PAN, Y.; LI, X. R.; WANG, Z. R.; FENG, L.; HUANG, L.; WANG, B. Y.; SUN, J. Y. Soil extracellular enzymes characteristics and their controlling factors along the elevation gradient in Qinghai-Tibet Plateau, China. **Applied Soil Ecology**, v. 188, p. 104862, 2023.

PATIL, N. P.; PATIL, K. P.; CHAUDHARI, B. L.; CHINCHOLKAR, S. B. Production, purification of exo-polygalacturonase from soil isolate *Paecilomyces variotii* NFCCI 1769 and its application. **Indian journal of microbiology**, v. 52, p. 240-246, 2012.

PEDREIRA, P. D.; LOBÃO, J. S. B.; DE VASCONCELOS, R. N. Reflexões acerca das produções científicas realizadas com a *Prosopis juliflora* (Sw.) DC.(Leguminosae) e os desdobramentos socioambientais da sua inserção no Semiárido nordestino. **Acta Geográfica**, v. 16, n. 42, p. 139-160, 2022.

PEÑA-AVELINO, L. Y.; PINOS-RODRÍGUEZ, J. M.; YÁÑEZ-ESTRADA, L.; JUÁREZ-FLORES, B. I.; MEJIA, R.; ANDRADE-ZALDIVAR, H. Chemical composition and in vitro degradation of red and white mesquite (*Prosopis laevigata*) pods. **South African Journal of Animal Science**, v. 44, n. 3, p. 298-306, 2014.

PERAZZO NETO, A. **Determinação de parâmetros para o enriquecimento protéico da palma (*Opuntia ficus-indica*) e vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) com *Aspergillus niger***. 1999. Tese de Doutorado. Tese Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

PONTECORVO, Gr.; ROPER, J. A.; CHEMMONS, L. M.; MACDONALD, K. D.; BUFTON, A. W. J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in genetics**, v. 5, p. 141-238, 1953.

POTURCU, K.; OZMEN, I.; BIYIK, H. H. Characterization of an alkaline thermostable pectin lyase from newly isolated *Aspergillus niger* _WHAK1 and its application on fruit juice clarification. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 42, p. 19-29, 2017.

PRADE, R. A.; ZHAN, D.; AYOUBI, P.; MORT, A. J. Pectins, pectinases and plant-microbe interactions. **Biotechnology and genetic engineering reviews**, v. 16, n. 1, p. 361-392, 1999.

PRAVEEN, K. D. Parametric optimizations for pectinase production by *Aspergillus awamori*. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 2, p. 093-098, 2020.

QUEIRÓS, M.; PEREIRA, G.; LEITE, A. C.; LEAL, R.; RODRIGUES, R.; TEIXEIRA, J. A.; PEREIRA, R. N. Tuning pectinase activity under the effects of electric fields in the enhanced clarification of wine must. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, p. 1053013, 2023.

RAGAB, W. S. M.; FARAG, M. K. A.; ALMOWALLAD, S. A. S. Production of Pectinase Enzymes by Citrus Fruits Contaminant Fungi. **Assiut Journal of Agricultural Sciences**, v. 41, n. 2, p. 1-19, 2010.

RAGHAVENDRA, R. M.; VADIRAJA, H. S.; NAGARATHNA, R.; NAGENDRA, H. R.; REKHA, M.; VANITHA, N. Effects of a yoga program on cortisol rhythm and mood states in early breast cancer patients undergoing adjuvant radiotherapy: a randomized controlled trial. **Integrative cancer therapies**, v. 8, n. 1, p. 37-46, 2009.

RAHMAN, Md M.; MAZUMDER, N. U. S.; FERDOUSI, U. S.; SHAHID, M. A.; HOQUE, M. B. Application of Biochemical in Textile. In: **Advanced Technology in Textiles: Fibre to Apparel**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 301-321.

RAM, B.; NEHRA, R.; KACHHAWAHA, S.; JAIN, D.; BIAS, B. Feeding effect of Mesquite (*Prosopis juliflora*) Pods on Growth Performance in Marwari Goats. **Acta Scientific Veterinary Sciences**, v. 4, n. 8, 2022.

RAMADAN, M. M. A. Effect of irrigation water quantity and some antioxidants on yield and some physiological traits of snap bean grown under sandy soil conditions. **Menoufia Journal of Plant Production**, v. 5, n. 1, p. 19-36, 2020.

RAMESH, A.; HARANI DEVI, P.; CHATTOPADHYAY, S.; KAVITHA, M. Commercial applications of microbial enzymes. **Microbial enzymes: roles and applications in industries**, p. 137-184, 2020.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. The genus *Aspergillus*. **The genus Aspergillus**, 1965.

RÊGO, E. S. B.; ROSA, C. A.; FREIRE, A. L.; DE RESENDE MACHADO, A. M.; GOMES, F. D. C. O.; DA COSTA, A. S. P. Cashew wine and volatile compounds produced during fermentation by non-Saccharomyces and Saccharomyces yeast. **Lwt**, v. 126, p. 109291, 2020.

REHMAN, H.; BALOCH, A. H.; NAWAZ, M. A. Pectinase: immobilization and applications. A review. **Trends in Peptide and Protein Sciences**, v. 6, p. 1-16 (e1), 2021.

RIBASKI, J.; DRUMOND, M. A.; OLIVEIRA, V. R.; NASCIMENTO, C. E. de S. Algaroba (*Prosopis juliflora*): Árvore de Uso Múltiplo para a Região Semiárida Brasileira. **Comunicado Técnico**. Colombo, PR Outubro, 2009. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2010/46391/1/CT240.pdf>. Acesso em: 23 out. 2023.

ROMBOUTS, F. M.; PILNIK, W. Pectinases and other cell-wall degrading enzymes of industrial importance. **Symbiosis**, 1986.

RUIZ, H. A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; HERNANDEZ-ALMANZA, A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR, C. N. Pectinolytic enzymes. *In: Current developments in biotechnology and bioengineering*. Elsevier, 2017. p. 47-71.

RUIZ-NIETO, J. E.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; HERNÁNDEZ-MARÍN, J.; MENDOZA-CARRILLO, J.; ABRAHAM-JUÁREZ, M.; ISIODIA-LACHICA, P. M.; MIRELES-ARRIAGA, A. I. Mesquite (*Prosopis* spp.) tree as a feed resource for animal growth. **Agroforestry Systems**, v. 94, n. 4, p. 1139-1149, 2020.

SAFRAN, J.; UNG, V.; BOUCKAERT, J.; HABRYLO, O.; MOLINIÉ, R.; FONTAINE, J. X.; *et al.* The specificity of pectate lyase VdPelB from *Verticillium dahliae* is highlighted by structural, dynamical and biochemical characterizations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 231, p. 123137, 2023.

SAHARAN, R.; SHARMA, K. P. Production, purification and characterization of pectin lyase from *Bacillus subtilis* isolated from moong beans leaves (*Vigna radiata*). **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 21, p. 101306, 2019.

SAHU, N.; INDIC, B.; WONG-BAJRACHARYA, J.; MERÉNYI, Z.; KE, H. M.; AHRENDT, S. Vertical and horizontal gene transfer shaped plant colonization and biomass degradation in the fungal genus *Armillaria*. **Nature microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1668-1681, 2023.

SALEH, I. **Effects of active phytochemicals of *Prosopis Juliflora* as anti-spoiling agents of postharvest fruits**. Dissertação de Mestrado. College of Arts and Sciences in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctorate of Philosophy in biological and Environmental Sciences. QATAR UNIVERSITY. 2022.

SALEH, I.; ABU-DIEYEH, M. H. Novel *Prosopis juliflora* leaf ethanolic extract as natural antimicrobial agent against food spoiling microorganisms. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 7871, 2021.

SALOMÃO, T. M. F.; AMORIM, A. C. R.; ALVES, V. M. C.; COELHO, J. L. C.; SILVA, D. O.; ARAUJO, E. F. D. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. **Revista de Microbiologia**, p. 15-8, 1996.;

SAMANTA, S. Microbial pectinases: a review on molecular and biotechnological perspectives. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 9, n. 2, p. 248, 2019.

SAMSON, R. A.; VISAGIE, C. M.; HOUBRAKEN, J.; HONG, S. B.; HUBKA, V.; KLAASSEN, C. H.; *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 78, n. 1, p. 141-173, 2014.

SANCHO, S. de O.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, R. W. D.; RODRIGUES, S.; SOUSA, P. H. M. D. Alterações químicas e físico-químicas no processamento de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Food Science and Technology**, v. 27, p. 878-882, 2007.

SANTOS, S. F. de M.; SOUSA, C. A. B.; ALMEIDA, A. F.; SANTOS, F. A.; OLIVEIRA, C. Z.; CARDOSO, A. L. D. C.; *et al.* Solid-State Fermentation: Use of Agroindustrial Residues. **Advances in the Domain of Environmental Biotechnology: Microbiological Developments in Industries, Wastewater Treatment and Agriculture**, p. 27-57, 2021.

SATHIYA, M.; MUTHUCHELIAN, K. Investigation of Phytochemical Profile and Antibacterial Potential of Ethanolic Leaf Extract of *Prosopis juliflora* DC. **Ethnobotanical leaflets**, v. 2008, n. 1, p. 167, 2008.

SEBASTIÃO, S. H. A. **Extração e Determinação de pectina na forma de pectato de cálcio da polpa do araçá amarelo**. Trabalho de Conclusão de Curso Química. Fundação Educacional do Município de Assis, FEMA. Assis, 2015.

SENTHILKUMAR, M.; ANANDHAM, R.; KRISHNAMOORTHY, R. *Paecilomyces*. In: **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. Academic Press, 2020. p. 793-808.

SETHI, B. K.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. Enhanced production of pectinase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using banana peels as substrate. **3 Biotech**, v. 6, p. 1-15, 2016.

SHARMA, A. D. *et al.* Photoprotective responses of aquatic organisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, n. 1-3, p. 28-42, 2001.

SHARMA, D. R. Solid-state fermentation for production of enzymes. **Indian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 1, 2016.

SHARMA, D.; SHARMA, G.; MAHAJAN, R. Development of strategy for simultaneous enhanced production of alkaline xylanase-pectinase enzymes by a bacterial isolate in short submerged fermentation cycle. **Enzyme and microbial technology**, v. 122, p. 90-100, 2019.

SHARMA, V.; TSAI, M. L.; NARGOTRA, P.; CHEN, C. W.; KUO, C. H.; SUN, P. P.; DONG, C. D. Agro-industrial food waste as a low-cost substrate for sustainable production of industrial enzymes: a critical review. **Catalysts**, v. 12, n. 11, p. 1373, 2022.

SHET, A. R.; DESAI, S. V.; ACHAPPA, S. Pectinolytic enzymes: classification, production, purification and applications. **Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 337-348, 2018.

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

SILVA, C. G. M. da; MELO FILHO, A. B. D.; PIRES, E. F.; STAMFORD, T. L. M. Caracterização físico-química e microbiológica da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). **Food Science and Technology**, v. 27, p. 733-736, 2007.

SILVA, Clóvis Gouveia da. **Otimização do processo de produção da aguardente de algaroba e aproveitamento dos resíduos sólidos em produtos alimentares**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2009. 237f.

SILVA, D.; CUNHA, F. M.; OLIVEIRA, J. E.; GIESE, E. C. Solid-state fermentation for the production of lipase from *Yarrowia lipolytica* using agroindustrial residues. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101365, 2019.

SILVA, D.; MARTINS, E. D. S.; SILVA, R. D.; GOMES, E. Production of pectinases by *Penicillium viridicatum* RFC3 using orange waste. **Food Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 15-23, 1997.

SILVA, G. M. H.; FERREIRA, G. F.; BEZERRA, N. S.; TAVARES, L. M.; ALMEIDA, A. F.; SOUSA, A. C. B. Produção de Amilase e Protease Obtidas por *Metarhizium Anisopliae* Var. Anisopliae Através da Fermentação em Estado Sólido. **Revista Saúde & Ciência**, v. 7, n. 2, p. 486-502, 2018.

SILVA, J. H. V.; SILVA, E. L. D.; JORDÃO FILHO, J.; TOLEDO, R. S.; ALBINO, L. F. T.; RIBEIRO, M. L. G.; COUTO, H. P. Valores energéticos e efeitos da inclusão da farinha integral da vagem de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC) em rações de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 2255-2264, 2002.

SILVA, L. L. da; MORGAN, T.; GARCIA, E. A.; ROSA, R. O.; MENDES, T. A. D. O.; QUEIROZ, M. V. Pectinolytic arsenal of *Colletotrichum lindemuthianum* and other fungi with different lifestyles. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 1857-1871, 2022.

SILVA, S. A. *et al.* Algaroba (*Prosopis juliflora*): uma árvore de múltiplos usos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 1, p. 107-114, 2015.

SILVA, S. A.; SILVA, E. L. D.; JORDÃO FILHO, J.; TOLEDO, R. S.; ALBINO, L. F. T.; RIBEIRO, M. L. G.; COUTO, H. P. Composição química e valores energéticos de vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*, DC.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 4, p. 1755-1763, 2002.

SILVA, S. A.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M. D.; ALENCAR, A. L.; PRASAD, S.; CAVALHEIRO, J. M. O. Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. **Química Nova**, v. 24, p. 460-464, 2001.

SILVA, V. D. A. da; SILVA, A. M. M.; E SILVA, J. H. C.; COSTA, S. L. Neurotoxicity of *Prosopis juliflora*: from natural poisoning to mechanism of action of its piperidine alkaloids. **Neurotoxicity Research**, v. 34, p. 878-888, 2018.

SIMÕES, L. F. *et al.* Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. suppl 1, 2020.

SINGH, R.; DAS, R.; SANGWAN, S.; ROHATGI, B.; KHANAM, R.; PEERA, S. P. G. Utilisation of agro-industrial waste for sustainable green production: a review. **Environmental Sustainability**, v. 4, n. 4, p. 619-636, 2021.

SINGH, R.; MITTAL, A.; KUMAR, M.; MEHTA, P. K. Microbial proteases in commercial applications. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 365-374, 2016.

SINITSYN, A. P.; SINITSYNA, O. A.; ROZHKOVA, A. M. Production of Industrial Enzymes Based on the Expression System of the Fungus *Penicillium verruculosum*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 57, p. 851-865, 2021.

SIROTEK, K.; MAROUNEK, M.; RADA, V.; BENDA, V. Isolation and characterization of rabbit caecal pectinolytic bacteria. **Folia microbiologica**, v. 46, p. 79-82, 2001.

SIVA, D.; SRIVETHI, G.; VASAN, P. T.; RAJESH, D.; ALFARHAN, A.; RAJAGOPAL, R. Enhanced cellulase enzyme production by *Aspergillus niger* using cellulase/iron oxide magnetic nano-composites. **Journal of King Saud University-Science**, v. 34, n. 1, p. 101695, 2022.

SON, Y. E.; YU, J. H.; PARK, H.S. Regulators of the asexual life cycle of *Aspergillus nidulans*. **Cells**, v. 12, n. 11, p. 1544, 2023.

SONG, P.; ZHANG, X.; WANG, S.; XU, W.; WANG, F.; FU, R.; WEI, F. Microbial proteases and their applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.

SOUSA, D.; SALGADO, J. M.; CAMBRA-LÓPEZ, M.; DIAS, A. C.; BELO, I. Degradation of lignocellulosic matrix of oilseed cakes by solid-state fermentation: fungi screening for enzymes production and antioxidants release. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 4, p. 1550-1560, 2022.

STEIN, R. B. D. S.; TOLEDO, L. R. A. D.; ALMEIDA, F. Q. D.; ARNAUT, A. C., PATITUCCI, L. T.; SOARES NETO, J.; COSTA, V. T. M. D. Uso do farelo de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora* (Swartz) DC) em dietas para eqüinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, 'p. 1240-1247, 2005.

SUDEEP, K. C.; UPADHYAYA, J.; JOSHI, D. R.; LEKHAK, B.; KUMAR CHAUDHARY, D.; RAJ PANT, B.; *et al.* Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. **Fermentation**, v. 6, n. 2, p. 59. 2020.

TACIN, M. V.; MASSI, F. P.; FUNGARO, M. H. P.; TEIXEIRA, M. F. S.; DE PAULA, A. V.; DE CARVALHO SANTOS-EBINUMA, V. Biotechnological valorization of oils from agro-industrial wastes to produce lipase using *Aspergillus* sp. from Amazon. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 17, p. 369-378, 2019.

TAVANO, O. L.; BERENGUER-MURCIA, A.; SECUNDO, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Biotechnological applications of proteases in food technology. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 17, n. 2, p. 412-436, 2018.

THAKUR, P.; SINGH, A. K.; SINGH, M.; MUKHERJEE, G. Extracellular alkaline pectinases production: a review. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 11, n. 5, p. e3745-e3745, 2022.

TOUNSI, H.; SASSI, A. H.; ROMDHANE, Z. B.; LAJNEF, M.; DUPUY, J. W.; LAPAILLERIE, D. Catalytic properties of a highly thermoactive polygalacturonase from the mesophilic fungus *Penicillium occitanis* and use in juice clarification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 127, p. 56-66, 2016.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, 2007.

ULUISIK, S.; SEYMOUR, G. B. Pectate lyases: Their role in plants and importance in fruit ripening. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125559, 2020.

- USTOK, F. I.; TARI, C.; GOGUS, N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. **Journal of biotechnology**, v. 127, n. 2, p. 322-334, 2007.
- VAN DEN EYNDEN, V.; CUEVA, E.; CABRERA, O. Wild foods from southern Ecuador. **Economic Botany**, v. 57, n. 4, p. 576-603, 2003.
- VASCONCELOS, N. M. de; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. de S. **Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.
- VIJAYARAGHAVAN, P.; KAMINI, N. R.; SINGH, S. K.; KAMINI, N. R. Utilization of agro-residues for the production of pectinase enzyme from *Aspergillus niger*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, 2016.
- VILARIÑO, F. *et al.* Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene encoding endopolygalacturonase from *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 2, p. 356-362, 1993.
- VINCKEN, J. P.; SCHOLS, H. A.; OOMEN, R. J.; BELDMAN, G.; VISSER, R. G.; VORAGEN, A. G. Pectin—the Hairy Thing: Evidence that homogalacturonan is a side chain of rhamnogalacturonan I. **Advances in pectin and pectinase research**, p. 47-59, 2003.
- VORAGEN, A. G.; COENEN, G. J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, p. 263-275, 2009.
- WILLATS, W. GT; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in food science & technology**, v. 17, n. 3, p. 97-104, 2006.
- WINARSA, R.; MUZAKHAR, K. Cellulase Production from *Paecilomyces lilacinus* ICP1 Using Coffee Pulp as Substrate. In: **4th International Conference on Life Sciences and Biotechnology (ICOLIB 2021)**. Atlantis Press, 2022. p. 510-516.
- WOJTASIK, W.; DYMIŃSKA, L.; HANUZA, J.; BURGBERGER, M.; BOBA, A.; SZOPA, J. Endophytic non-pathogenic *Fusarium oxysporum* reorganizes the cell wall in flax seedlings. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1352105, 2024.
- XIE, H.; WU, B.; LIU, G.; LI, X. Optimization of in situ cellulase production from *Penicillium oxalicum* P-07 under submerged fermentation conditions with different cellulose types. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 3, p. 110290, 2023.
- YANDA, L.; TATSIMO, S. J. N.; MATSUETE, G. T.; LEUTCHA, P. B.; FONGANG, S. Y. F.; LANNANG, A. M. *et al.* Prosojuliflavone and other constituents from *Prosopis juliflora* Swartz DC (Fabaceae) and their chemotaxonomic importance. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 105, p. 104508, 2022.
- YANG, C.; ZHANG, T.; ZHU, J.; WEI, Y.; ZHU, F.; CHENG, Z. Heterologous Expression and Characterization of a Novel Exo-Polygalacturonase from *Aspergillus fumigatus* Af293 and Its Application in Juice Extraction. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 533, 2023.

YAPO, B. M.; LEROUGE, P.; THIBAUT, J. F.; RALET, M. C. Pectins from citrus peel cell walls contain homogalacturonans homogenous with respect to molar mass, rhamnogalacturonan I and rhamnogalacturonan II. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 3, p. 426-435, 2007.

YASIN, N.; KHAN, J.; KHATTAK, K. F.; REHMAN, S. U.; ANEES, M. Pectinolytic potential of indigenous *Trichoderma strains* originated from the north western regions of Pakistan. **Pak. J. Bot**, v. 54, n. 2, p. 711-715, 2022.

YU, J. H. Regulation of development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. **Mycobiology**, v. 38, n. 4, p. 229-237, 2010.

ZDUNEK, A.; PIECZYWEK, P. M.; CYBULSKA, J. The primary, secondary, and structures of higher levels of pectin polysaccharides. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 1, p. 1101-1117, 2021.

ZEUNER, B.; THOMSEN, T. B.; STRINGER, M. A.; KROGH, K. B.; MEYER, A. S.; HOLCK, J. Comparative characterization of *Aspergillus* pectin lyases by discriminative substrate degradation profiling. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 873, 2020.

ZHENG, L.; XU, Y.; LI, Q.; ZHU, B. Pectinolytic lyases: a comprehensive review of sources, category, property, structure, and catalytic mechanism of pectate lyases and pectin lyases. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, p. 1-13, 2021.

ZULKIFLI, N. A.; ZAKARIA, L. Morphological and molecular diversity of *Aspergillus* from corn grain used as livestock feed. **HAYATI journal of biosciences**, v. 24, n. 1, p. 26-34, 2017.