



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

IARA LEANDRO DOS SANTOS

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE FRUTOS
AMAZÔNICOS PRODUTORES DE PECTINASES
PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL**

Palmas- TO

2022

IARA LEANDRO DOS SANTOS

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE FRUTOS
AMAZÔNICOS PRODUTORES DE PECTINASES PARA
APLICAÇÃO INDUSTRIAL**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Linha de pesquisa: Biotecnologia aplicada à indústria de alimentos

Orientador: Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Coutinho de Paula-Elias

Palmas- TO

2022

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

- L437p Leandro dos Santos, Iara.
 Prospecção de microrganismos de frutos amazônicos produtores de
 pectinases para aplicação industrial. / Iara Leandro dos Santos. – Palmas, TO,
 2022.
 94 f.
 Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
 – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em
 Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2022.
 Orientador: Alex Fernando de Almeida
 Coorientador: Fabricio Coutinho de Paula-Elias
 1. Pectinase. 2. Pupunha. 3. Tucumã. 4. Bacupari. I. Título

CDD 664

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

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

IARA LEANDRO DOS SANTOS

**PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS DE FRUTOS
AMAZÔNICOS PRODUTORES DE PECTINASES
PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL**

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 24 de fevereiro de 2022, pela Banca
Examinadora constituída pelos membros:

Prof. Dr. Marcelo Andres Umsza Guez
UFBA

Prof.^a Dr.^a Solange Cristina Carreiro
UFT

Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida
Orientador - UFT

Dedico este trabalho aos meus pais,
Idelcy e Lindovaldo e a minha
sobrinha, Ana Heloísa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meu caminho e nunca me deixar desistir dos meus sonhos.

A minha família, meus pais, Lindovaldo e Idelcy, minha irmã Lorrane, minha sobrinha Ana Heloísa, meus avós, Amélia e Francisco, vocês são minha força. Obrigada pelo suporte e apoio ao longo destes dois anos

Em especial, agradeço ao meu primo Robson, por ser meu melhor amigo, me auxiliando em todos os momentos da vida na pesquisa. Obrigada por não medir esforços para me ajudar sempre. Aos meus tios Ivaldo e Hannah, pelo apoio financeiro e por acreditarem nesse objetivo tanto quanto eu.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida, por ter me passado todo o conhecimento necessário para a conclusão da dissertação, pela amizade e por me confiar esse projeto. Seus ensinamentos foram essenciais para o meu crescimento profissional.

Ao meu coorientador, Dr. Fabrício Coutinho, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e pelas horas disponíveis me orientando e me motivando na vida acadêmica.

Agradeço aos meus amigos, Lunara, Alanna, Eduardo, Annanda e Hermannny, pelos momentos de diversão, pelos abraços e palavras doces nas horas difíceis e por estarem comigo sempre que precisei.

Agradeço aos colegas de laboratório, Iarley, Jonatas, Fernanda Leal Zimmer, Dheyson, Débora e Larissa, pelo auxílio na realização dos experimentos.

A Profa. Dra. Solange Carreiro, por ter disponibilizado seu laboratório para a realização das análises e pelo carinho durante este período. Obrigada por fazer parte da conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Andres Umsza, da Universidade Federal da Bahia, pela avaliação do meu trabalho desde o pré-projeto até a conclusão final. Suas considerações foram muito importantes.

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

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

RESUMO

As enzimas pectinolíticas são utilizadas industrialmente em diversas aplicações, como por exemplo, na extração de pigmentos. O trabalho teve como objetivo caracterizar microrganismos endofíticos isolados dos frutos amazônicos pupunha, tucumã e bacupari, quanto ao potencial para a produção de enzimas pectinolíticas, e sua aplicação na extração de carotenóides em tomates. O isolamento dos microrganismos foi realizado a partir dos frutos em fermentação espontânea em intervalos de 0, 72, 144, 216, 288, 360 horas. No presente estudo foram isoladas 1.938 colônias. A triagem ocorreu em placas contendo 1% de pectina cítrica (m/v), 1,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/L de KH_2PO_4 , 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,5 g/L de Na_2HPO_4 , 1 g/L de extrato de levedura, 1,5% de ágar e em cultivo submerso contendo pectina cítrica e meio mínimo mineral, no qual os cultivos foram inoculados com 2 mL da suspensão de células e mantidos a 150 rpm, 30 °C por 48 horas. Das colônias isoladas, 45 apresentaram atividade pectinolítica, sendo a linhagem *Klebsiella oxytoca* considerada a mais promissora, apresentando uma atividade pectinolítica de 1,38 U/mL. A análise estatística da atividade enzimática revelou que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as atividades. A identificação molecular demonstrou uma variedade de espécies bacterianas do gênero *Klebsiella* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea* sp., *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kosakonia arachidis*, *Enterobacter* sp, *Micrococcus aloeverae*, *Raoultella planticola*, *Cronobacter sakazakii*, *Stenotrophomonas pavanii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Proteus*, *Acinetobacter radioresistens*, *Pseudomonas aeruginosa* e 1 levedura do gênero *Candida* sp. Os 45 microrganismos foram testados para extração de carotenóides em tomates, dos quais 7 amostras apresentaram resultados superiores à amostra controle, sendo o extrato pectinolítico de *Kosakonia* o que apresentou o melhor rendimento (63%). Os 7 isolados promissores para a extração de carotenóides foram analisados bioquimicamente em relação à temperatura e pH ótimo de atividade enzimática. Em relação à temperatura, as enzimas apresentaram temperaturas ótimas de 30°C a 50°C e pH ótimo na faixa de acidez de 3,0 a 5,5. Os resultados deste trabalho demonstram a viabilidade da prospecção de microrganismos de frutos amazônicos para a obtenção de pectinases e aplicação na extração de carotenóides.

Palavras-chave: pectinase, pupunha, tucumã, bacupari, *Klebsiella*.

ABSTRACT

Pectinolytic enzymes are used industrially in several applications, for example, in the extraction of pigments. The objective of this work was to characterize endophytic microorganisms isolated from peach palm, tucumã and bacupari Amazonian fruits, regarding their potential for the production of pectinolytic enzymes, and their application in the extraction of carotenoids in tomatoes. The isolation of microorganisms was carried out from the fruits in spontaneous fermentation at intervals of 0, 72, 144, 216, 288, 360 hours. In the present study, they were isolated 1.9 3 8 colonies. The sorting took place on plates containing 1% citrus pectin (m/v), 1.4 g/L (NH₄)₂SO₄, 2 g/L KH₂PO₄, 0.2 g/L MgSO₄·7H₂O, 3.5 g/L of Na₂HPO₄, 1 g/L of yeast extract, 1.5% of agar and in submerged culture containing citrus pectin and minimal mineral medium, in which the cultures were inoculated with 2 mL of the cell suspension and kept at 150 rpm, 30°C for 48 hours. Of the colonies isolated, 45 showed pectinolytic activity, with the strain *Klebsiella oxytoca* being considered the most promising, presenting a pectinolytic activity of 1.38 U/mL. Statistical analysis of enzymatic activity revealed that there was a significant difference (p<0.05) between activities. Molecular identification showed a variety of bacterial species of the genus *Klebsiella* sp., *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea* sp., *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kosakonia arachidis*, *Enterobacter* sp, *Micrococcus aloeverae*, *Raoultella planticola*, *Cronobacter sakazakii*, *Stenotrophomonas pavanii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Proteus* *Acinetobacter radioresistens*, *Pseudomonas aeruginosa* and 1 yeast of the *Candida* sp. The 45 microorganisms were tested for the extraction of carotenoids in tomatoes, of which 7 samples presented better results than the control sample, being the pectinolytic extract of *Kosakonia* the one that presented the best yield (63%). The 7 isolates promising for the extraction of carotenoids were biochemically analyzed in relation to temperature and optimal pH of enzymatic activity. Regarding temperature, the enzymes showed optimal temperatures from 30°C to 50°C and optimal pH in the acidity range of 3.0 to 5.5. The results of this work demonstrate the feasibility of prospecting microorganisms from Amazonian fruits to obtain pectinases and use them in the extraction of carotenoids.

Keywords: pectinase, peach palm, tucumã, bacupari, *Klebsiella*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A: Frutos maduros do bacupari (<i>Garcinia gardneriana</i>); B: semente e polpa do fruto.....	19
Figura 2. Frutos da espécie <i>Bactris gasipaes</i> (pupunha).....	20
Figura 3. Palmeira <i>Arecaceae</i> e frutos tucumã (<i>Astrocaryum vulgare</i>).....	21
Figura 4. Representação da homogalacturonana, ramnogalacturonana I e ramnogalacturonana II.....	24
Figura 5. Mecanismo de ação das pectinases. (a): poligalacturonase (PG) e polimetilgalacturonase (PMG); (b): pectinaesterase (PE); e (c): polimetilgalacturonato liase (PGL) e pectina liase (PL). As siglas indicam os locais onde as enzimas reagem com as substâncias pécicas.	25
Figura 6. O mecanismo de extração enzimática de compostos bioativos.....	31
Figura 7. 1.938 colônias isoladas dos frutos amazônicos bacupari, tucumã e pupunha em fermentação espontânea.....	46
Figura 8. Triagem em placa da atividade de pectinase de isolados do bacupari, apresentando zonas claras após aplicação de solução reveladora de iodo como indicativo de produção de enzima.....	47
Figura 9. Colônias isoladas dos frutos bacupari, tucumã e pupunha que apresentaram resultados positivos para pectinase.....	48
Figura 10. Cultivo submerso das linhagens de microrganismos isolados de frutos debacupari para a produção de enzimas pectinolíticas.....	49
Figura 11. Caracterização morfológica dos isolados da pupunha, tucumã e bacupari. Legenda: A grupos microbianos; B morfologia celular; C coloração de Gram; D catalase; E teste de oxidase.....	54
Figura 12. Isolados do fruto bacupari, tucumã e pupunha e suas respectivas espécies.....	63
Figura 13. Extração de carotenóides com extrato enzimático de linhagens bacterianas isoladas de frutos bacupari e tucumã.....	65
Figura 14. Valores de temperatura ótima para atividade pectinolítica de linhagens bacterianas.Legenda: A= <i>C. sakazakii</i> (TCLB 25), B= <i>B. Amyloliquefaciens</i> (BCLB 197 A).	66

Figura 15. Valores de temperatura ótima para atividade pectinolítica de linhagens bacterianas. Legenda: C= <i>K. aerogenes</i> (BCLB 197 B), D= <i>Proteus</i> sp. (BCLB 122), E= <i>Kosakonia</i> sp. (TCMK 112), F= <i>Kosakonia</i> sp. (TCMK 109).....	67
Figura 16. Valores de temperatura ótima para atividade pectinolítica de linhagens bacterianas. Legenda: G= <i>K.aerogenes</i> (BCLB 179).....	67
Figura 17. Valores de pH ótimo para atividade pectinolítica de linhagens bacterianas. Legenda: A= <i>C. sakazakii</i> (TCLB 25), B= <i>B. Amyloliquefaciens</i> (BCLB 197 A) , C= <i>K. aerogenes</i> (BCLB 197 B), D= <i>Proteus</i> sp. (BCLB 122).....	69
Figura 18. Valores de pH ótimo para atividade pectinolítica de linhagens bacterianas. E= linhagem <i>Kosakonia</i> sp. (TCMK 112), F= linhagem <i>Kosakonia</i> sp. (TCMK 109), G= <i>K. aerogenes</i> (BCLB 179).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolamento de microrganismos endofíticos de frutos.....	18
Tabela 2. Fontes microbianas de enzimas pectinolíticas.....	26
Tabela 3. Aplicação de enzimas na extração de compostos bioativos.....	29
Tabela 4. Enzimas pectinases na clarificação de sucos de frutas.....	31
Tabela 5. Aplicação de pectinases em vinhos e resultados da aplicação.....	32
Tabela 6. Triagem de linhagens microbianas isoladas de frutos pupunha, tucumã e bacupari com potencial para a produção de pectinase.	48
Tabela 7. Triagem de linhagens microbianas isoladas de frutos pupunha, tucumã e bacupari com potencial para a produção de pectinase.....	49
Tabela 8. Quantificação da atividade enzimática dos 45 microrganismos produtores de pectinase.....	52
Tabela 9. Análise de variância das atividades enzimáticas obtidas das linhagens isoladas dos frutos amazônicos.....	53
Tabela 10. Teste de tukey das atividades enzimáticas obtidas das linhagens isoladas dos frutos amazônicos.....	53
Tabela 11. Análise de extração de DNA.....	57
Tabela 12. Análise de extração de DNA.....	58
Tabela 13. Identificação e similaridade das linhagens isoladas dos frutos pupunha, tucumã e bacupari.....	60
Tabela 14. Continuação- Identificação e similaridade das linhagens isoladas dos frutos pupunha, tucumã e bacupari.....	61
Tabela 15. Continuação- Identificação e similaridade das linhagens isoladas dos frutos pupunha, tucumã e bacupari.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

E.C.: Enzyme Commission

LB: Caldo lisogênico

pH: potencial hidrogeniônico K₂HPO₄: Fosfato dipotássico MgSO₄ : Sulfato de magnésio

Na₂HPO₄: Fosfato de sódio dibásico HCL: Ácido clorídrico

NaOH: Hidróxido de sódio rpm: rotação por minuto PCR: Cadeias de polimerase RNA: Ácido ribonucleico

DNA: Ácido desoxirribonucleico

PPLB: Microrganismo isolado da pupunha em meio LB

PPMK: Microrganismo isolado da pupunha em meio MacConkey

TCLB: Microrganismo isolado do tucumã em meio LB

TCMK: Microrganismo isolado do tucumã em meio macConkey

BCLB: Microrganismo isolado do bacupari em meio LB

BCMK: Microrganismo isolado do bacupari em meio macConkey

MM: Meio mineral

NaCL: Cloreto de sódio

DNS: Ácido 3,5-dinitrosalicílico

UFC: Unidades formadoras de colônia

°C: graus Celsius

U/mL: unidade de enzima por mL PMG: Polimetilgalacturonase

PG: Poligalacturonase

PE: Pectina Esterase

PGL: Polimetilgalacturonase

PL: Pectina Liase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Diversidade de frutos amazônicos.....	18
2.1.1 Bacupari (<i>Garcinia gardneriana</i>).....	18
2.1.2 Pupunha (<i>Bactris gasipaes</i>)	20
2.1.3 Tucumã (<i>Astrocaryum vulgare</i>).....	21
2.2 Isolamento de microrganismos autóctones de frutos	21
2.3 Enzimas pectinolíticas: classificação e mecanismo de ação	23
2.4 Fontes de obtenção de enzimas pectinolíticas.....	28
2.5 Aplicações de enzimas pectinolíticas.....	29
2.5.1. Extração de compostos bioativos.....	29
2.5.2 Indústrias de sucos.....	32
2.5.3 Vinhos.....	33
2.5.4 Indústria de ração animal.....	35
2.5.4 Indústria de biorrefinaria.....	36
2.5.5 Biolimpeza.....	36
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Coleta dos frutos e fermentação.....	37
4.2 Isolamento dos microrganismos.....	38
4.3 Seleção dos microrganismos produtores de pectinases.....	40
4.3.2 Triagem de microrganismos pectinolíticos em placa.....	40
4.3.3 Triagem de microrganismos pectinolíticos em cultivos submersos.....	40
4.4 Determinação da atividade enzimática.....	41
4.4.1 Análise estatística da atividade enzimática.....	42
4.5 Caracterização dos microrganismos produtores de pectinases.....	42
4.5.1 Caracterização morfológica e bioquímica.....	42
4.5.2 Coloração de Gram.....	42

4.5.3	Morfologia celular.....	42
4.5.4	Teste de Catalase.....	42
4.5.5	Teste de Oxidase.....	42
4.6	Identificação Molecular.....	43
4.7	Propriedades Bioquímicas das Pectinases Produzidas.....	44
4.7.1	Determinação da temperatura ótima e pH ótimo da atividade enzimática.....	44
4.8	Tratamento Enzimático para a extração de carotenóides.....	44
4.8.1	Análise de Carotenóides.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1	Isolamento de microrganismos.....	45
5.2	Triagem de microrganismos pectinolíticos em placa.....	46
5.3	Triagem de microrganismos pectinolíticos em cultivos submersos.....	48
5.4	Análise estatística.....	50
5.5	Caracterização dos microrganismos produtores de pectinases.....	50
5.5	Identificação molecular	53
5.6	Análise de Carotenóides.....	60
5.7	Propriedades Bioquímicas das Pectinases Produzidas.....	61
5.8.1	Determinação das melhores condições de temperatura e sua influência na atividade enzimática.....	62
5.8.2	Determinação das melhores condições de pH e sua influência na atividade enzimática.....	64
6	CONCLUSÕES.....	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui grande variedade de frutas nativas com alto valor nutricional e potencial econômico ainda pouco explorado, sendo necessários estudos a fim de agregar valor e desenvolver novas formas de aproveitamento. A Amazônia se destaca nesse cenário por possuir mais de 200 espécies frutíferas comestíveis o que equivale a 44% da diversidade desse tipo de planta no Brasil (SOUZA et al., 2012; NEVES et al., 2015).

Entre essas espécies de frutas encontram-se o tucumã (*Astrocaryum vulgare*) e a pupunha (*Bactris gasipaes*), que são palmeiras pertencentes à família *Arecaceae*, muito populares na região norte do Brasil. Os frutos dessas palmeiras geralmente são consumidos *in natura* ou na forma de preparo para pratos regionais (MAIA et al., 2014).

O tucumã possui características nutricionais atraentes. A sua polpa apresenta compostos bioativos como flavonoides e β -caroteno (COSTA et al., 2012; YUYAMA et al., 2008). A pupunha, a qual apresenta epicarpo e mesocarpo variando de amarelo a laranja, é consumida principalmente após cocção em água salgada. É uma fruta com altos níveis de fibra alimentar, óleos, carotenoides (β -caroteno, γ -caroteno, licopeno), minerais e aminoácidos essenciais (CHISTÉ; FERNANDES, 2016; ESPINOSA et al., 2014; ORDÓÑEZ-SANTOS et al., 2015).

O bacupari (*Garcinia gardneriana*) é um fruto nativo do Brasil, encontrado principalmente na Amazônia. O gênero *Garcinia* possui uma diversidade de compostos bioativos, como benzofenonas, xantonas e flavonoides. Os compostos bioativos presentes nos extratos da casca e semente do fruto possuem propriedades antimicrobianas, ansiolíticas, leishmanicidas e fotoprotetoras (RODRIGUES et al., 2021, ARWA et al., 2015; GONTIJO et al., 2012; CARVALHO-SILVA et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2014; CASTRO MOREIRA; FIGUEIREDO et al., 2014; MOREIRA et al., 2017; SANTA-CECÍLIA et al., 2011; MOREIRA et al., 2018).

Além de todas as propriedades nutricionais, pupunha, tucumã e bacupari apresentam grande potencial para obtenção de microrganismos endofíticos. Os endofíticos são microrganismos que habitam simbioticamente os tecidos internos sem causar danos ao seu

hospedeiro. Normalmente estão localizados nas folhas, frutos, raízes, caules, flores e sementes. Esses microrganismos constituem um grupo interessante com um potencial para a descoberta de inúmeros bioprodutos, como por exemplo, enzimas (ADRIO; DEMAÏN, 2014; GRONDIN et al., 2015; PALMERÍN-CARREÑO et al., 2015; RODRIGUEZ et al., 2016; SONG et al., 2017; VESPERMANN et al., 2017).

As enzimas são muito utilizadas em processos industriais por serem catalisadores ecologicamente corretos. As de origem microbianas possuem maior interesse industrial devido sua susceptibilidade a manipulações genéticas, favorecendo o melhoramento de linhagens para o emprego em processos industriais. Por esse motivo, são reconhecidas como altamente eficientes para o desenvolvimento e otimização de processos industriais. Dessa forma, considerando a rica biodiversidade brasileira, existe um interesse considerável em se encontrar espécies de microrganismos com potencial para aplicação biotecnológica (SILVIA; FONSECA, 2016; GARG et al., 2016; CLAUS, 2017).

Pectinases são enzimas que atuam transformando a pectina complexa em moléculas de ácido monogalacturônico. Elas classificam-se em: pectinesterase (EC 3.1.1.11), poligalacturonase (EC 3.2.1.15), galacturan 1,4- α -galactouronidase (EC 3.2.1.67), exopoli- α -galactouronosidase (EC 3.2.1.82), endopectato-liase (EC 4.2.2.2), exopectato-liase (EC 4.2.2.9) e endopectina-liase (EC 4.2.2.10) (GARG et al., 2016).

As enzimas pectinolíticas têm sido utilizadas na indústria de alimentos para despectinização de vários sucos, incluindo laranja, maçã, manga, abacaxi, uva, mamão, melhorando a qualidade, rendimento e filtrabilidade dos sucos de frutas. Possuem influência considerável nas propriedades sensoriais e tecnológicas dos vinhos, têm aplicações nas indústrias de tratamento de têxteis, papel, tratamento de águas residuais, fermentação de café, chá, extração de óleo vegetal e pigmentos (GHOSH; BISWAS, 2016; KOHLI; GUPTA, 2015; MERÍN et al., 2015; PATIDAR et al., 2018; RAJDEO et al., 2016; SOJITRA et al., 2016).

A crescente conscientização sobre o impacto dos solventes no meio ambiente levou a uma busca por métodos mais sustentáveis de extrair biomoléculas de fontes naturais. A extração assistida por enzimas é uma forma segura, eficiente e ecológica, sendo relatada por vários pesquisadores como o melhor método para a extração (JIN et al., 2012; HUO et al., 2015; NATH et al., 2016; PURI et al., 2012).

A extração assistida por enzimas consiste na ruptura da parede celular da planta, hidrolisando-a utilizando a enzima como catalisador, com o objetivo de liberar componentes intracelulares. Este método de extração garante uma recuperação seletiva e mais alta de cores naturais, reduzindo o uso de solventes. Além disso, uma atividade mista enzimática de

pectinases (pectinaesterase, pectina- liase e poligalacturonase) e outras enzimas, podem contribuir para uma quebra mais completa, melhorando ainda mais a extração de pigmentos (LENUCCI et al., 2015; SHELDON; VANPELT, 2013; SOWBHAGYA; CHITRA, 2010; ÖZKAN; BILEK, 2015).

Diante da importância das enzimas pectinases na indústria de alimentos e da busca por explorar novas fontes de microrganismos produtores dessas enzimas, os frutos amazônicos (pupunha, tucumã e bacupari) podem ser possíveis fontes de microrganismos produtores de pectinases capazes de agregar valor em diversas aplicações biotecnológicas com futura aplicação comercial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Diversidade de frutos amazônicos

A Amazônia apresenta a maior biodiversidade do mundo com várias espécies frutíferas nativas que possuem características sensoriais únicas e uma variedade de compostos benéficos à saúde, apesar dessa biodiversidade, muitas frutas nativas permanecem pouco exploradas, ou desconhecidas, devido à falta de informações sobre o potencial tecnológico e dados escassos sobre seus compostos funcionais (MELO et al., 2021, AVILA-SOSA et al., 2019, COSTA et al., 2013; DEMBITSKY et al., 2011; RÓGEZ et al., 2004; CAVALCANTE et al., 2006; LORENZI et al., 2006; DUARTE, 2011; SOUZA et al., 2011; GARZÓN et al., 2012; RIBEIRO; FERREIRA, 2008).

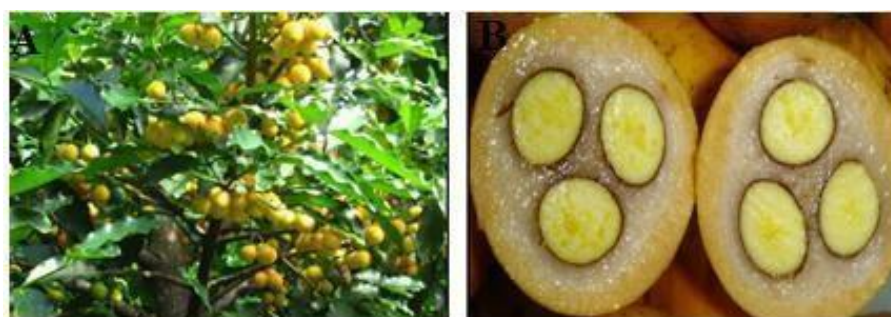
Dentre essas frutas nativas encontram-se o açaí (*Euterpe oleracea*), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), abiu (*Pouteria caimito*), achachairu (*Garcinia humilis*), araçá-boi (*Eugenia stipitata ssp*), bacaba-açu (*Oenocarpus bacaba*), bacuri (*Platonia insignis*), buriti (*Mauritia flexuosa*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), cacau (*Theobroma cacao*) e Uxi (*Endopleura uchi*) (RÓGEZ et al., 2004; CAVALCANTE et al., 2006; LORENZI et al., 2006; DUARTE, 2011; SOUZA et al., 2011; GARZÓN et al., 2012). Além desses frutos, encontram-se também o bacupari (*Garcinia gardneriana*), pupunha (*Bactris gasipaes*) e o tucumã (*Astrocaryum aculeatum*).

2.1.1 Bacupari (*Garcinia gardneriana*)

O bacupari é uma planta frutífera de origem amazônica pertencente à família *Clusiaceae*. O bacuparizeiro é encontrado na margem de rios e córregos, possui de 9 a 14

metros de altura e floresce de agosto a setembro. Em determinadas épocas, esta espécie pode suportar inundações por vários dias o que facilita sua adaptação às mudanças ambientais (BARROSO et al., 2002; DONADIO et al., 2002; MARINHO et al., 2013; DE SOUZA et al., 2013). Os frutos do bacupari (figura 1), são bagas de 3 a 4 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro. Possui formato oval, casca amarela, polpa branca mucilaginosa com sabor adocicado e contem 3 sementes. (GUIMARÃES et al., 2004; DONADIO et al., 2002, SANTA-CECÍLIA et al., 2011).

Figura 1. A: Frutos maduros do bacupari (*Garcinia gardneriana*); B: semente e polpa.



Fonte: Araujo (2017)

O fruto possui características nutricionais interessantes, apresenta 20,12 g/100 g de carboidratos, 0,48 g/100 g de proteínas, 24,19% de açúcares, 0,90 mg/100 g de ácido ascórbico e 0,21 g/100 g de lipídios (MARQUES et al., 2017; SCHNEIDER et al., 2020). O gênero *Garcinia* é uma importante fonte de compostos bioativos, como 7- Epiclusianona, gutiferona-A e moreloflavona (MAIA et al., 2018; NAVES et al., 2019; MOREIRA et al., 2017).

Pesquisas demonstram que os compostos bioativos presentes nos extratos da casca e semente do bacupari apresentam propriedades anti-inflamatórias, ansiolíticas, antimicrobianas, leishmanicidas e fotoprotetoras. Apesar dos estudos realizados sobre as propriedades fitoquímicas, farmacêuticas e medicinais desta fruta, atualmente existem poucos relatos na literatura sobre a sua utilização no desenvolvimento de produtos na indústria alimentícia (MARTINS et al., 2008, SANTA-CECÍLIA et al., 2011; VELOSO et al., 2018; NALDONI et al., 2009; GONTIJO et al., 2012; PEREIRA et al. 2010; FIGUEIREDO et al., 2014; MELO et al., 2021).

Melo et al. (2021) produziram uma farinha com subprodutos do bacupari (casca e a semente), com objetivo de encontrar novas fontes de farinha para a produção de alimentos ricos em fibras e compostos bioativos. As farinhas produzidas apresentam alto teor de fibras e

boa fonte de proteína, além de compostos fenólicos como quinina, ácido *p*-cumárico, *m*-cumárico e formononetina, que são benéficos para a saúde humana.

2.1.2 Pupunha (*Bactris gasipaes*)

A pupunheira (*Bactris gasipaes* (Kunth)) é uma palmeira nativa da Amazônia pertencente à família *Arecaceae*. Esta planta possui característica perenifolia, estirpe ereta, diâmetro entre 15 e 30 centímetros e pode atingir até 25 metros de altura. Seus frutos (Figura 2) são pequenas drupas com comprimento de 4 a 6 cm e largura de 3 a 5 cm, apresenta formas diversificadas (cônica, ovóide ou elipsoide) e peso que pode variar de 20 a 205 gramas. Sua polpa é incolor, carnosa e amilácea, possui uma única semente (rígida/ fibrosa) e sabor agridoce suave (VALENCIA et al., 2015; NERI-NUMA et al., 2018; DA COSTA et al., 2019; CHISTÉ; FERNANDES, 2016; CLEMENT et al., 2004).

Figura 2. Frutos da espécie *Bactris gasipaes* (pupunha).



Fonte: Ibipiana et al. (2021)

A pupunha é uma fruta altamente nutritiva, possui 62,28% de carboidratos, 3,90% de proteínas, 18,73% de lipídios e 4,11% de fibras. Além disso, é uma importante fonte de potássio, ferro, zinco e manganês. Esta fruta destaca-se pelo seu alto teor de vitamina A, três vezes maior do que a dose diária recomendada. A vitamina A desempenha papéis fisiológicos importantes como modulação de funções ópticas, reprodutivas e imunológicas (SANTOS et al., 2017; HU et al., 2020). A polpa da pupunha apresenta teores consideráveis de compostos fenólicos, como flavonoides, antocianinas e carotenóides (β -caroteno, γ -caroteno e *cis* - γ -caroteno) (SANTOS et al., 2015).

Apesar do consumo tradicional da pupunha após cozimento em água salgada, a fruta é utilizada em várias preparações alimentares, como saladas, tortas e doces. Além do uso alimentício, a pupunheira possui outros aproveitamentos, sua raiz apresenta atividades vermícidas, o tronco é utilizado para construção de casas, arcos e varas de pescar e sua palmeira é empregada na área da arquitetura (MATOS, 2019; PIRES et al., 202; GRAEFE et al., 2013).

2.1.3 Tucumã (*Astrocaryum vulgare*)

O *Astrocaryum vulgare* é uma palmeira pertencente à família *Arecaceae*, possui até 25 metros de altura e troncos espinhosos, sua frutificação ocorre nos períodos de janeiro a abril e cada árvore pode produzir de 2 a 5 cachos de frutos por ano, contendo de 200 a 400 frutos (OLIVEIRA et al., 2018; SHANLEY et al., 2012; SAGRILLO et al., 2015; CARNEIRO et al., 2017).

Conhecido por uma diversidade de nomes no Brasil, como tucumã-arara, tucumã-piranga, tucumã-piririca, tucum-assu, tucum-bravo, tucum-da-serra, tucum-do-matto e tucum-purupuru, os frutos do tucumã (figura 3) são drupas ovóides, possuem apenas uma semente por fruto e mesocarpo fibroso e nutritivo com coloração que varia do amarelo ao laranja. O fruto tem diâmetro de 5 a 6 cm e peso que varia de 70 a 75 gramas, sendo muito consumido *in natura* ou utilizado em preparações de pratos regionais (SAGRILLO et al., 2015; MATOS et al., 2019; MAIA et al., 2014).

Figura 3. Palmeira *Arecaceae* e frutos tucumã (*Astrocaryum vulgare*).



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

O tucumã apresenta em sua composição centesimal 412,73 kcal de energia, 44,9g/100g de umidade, 10,9g/100g de fibras, 3,5g/100g de proteínas, 8,5g/100g de carboidratos e 40,5g/100g de gorduras. Além disso, possui uma das maiores concentrações de provitamina A-betacaroteno com 52 mg/100g de polpa (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007). O fruto é fonte de compostos bioativos, principalmente carotenóides. O principal carotenóide presente no tucumã é o alltrans-b-caroteno, representando 75% do conteúdo total, seguido por 13-cis-b-caroteno, all-trans-a-caroteno e all-trans-b- criptoxantina, cada um representando de 2,0% a 2,8% do conteúdo total de carotenóides (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007).

Na indústria de alimentos a polpa do fruto é muito utilizada para produzir cremes e sorvetes. Na indústria cosmética o óleo extraído da polpa é utilizado em hidratantes para a pele, produtos para o cabelo e loções corporais (BERGMANN et al., 2013).

2.2 Isolamento de microrganismos autóctones de frutos

Os frutos apresentam uma grande variedade de microrganismos, como bactérias, leveduras e bolores e essa diversidade está associada a diversos fatores que incluem condições ambientais, características nutricionais, condições físico-químicas, estágio de maturação, entre outros (FESSARD; REMIZE, 2019; RODRÍGUEZ et al., 2019; BERG; SMALLA, 2009; MARSCHNER et al., 2004; COMPANT et al., 2005).

Os microrganismos são classificados em epifíticos, quando habitam a superfície das plantas ou endofíticos, quando colonizam os tecidos internos. Os endofíticos vivem em cooperação mutuamente benéfica com seu hospedeiro, aumentando a tolerância ao estresse biótico e abiótico, auxiliando no crescimento da planta, bem como na melhoria do fornecimento de nutrientes (DROBY et al., 2016; KAUL et al., 2016).

O isolamento de microrganismos autóctones consiste primeiramente, na eliminação dos microrganismos epifíticos, através da lavagem da superfície com etanol 70% seguido de tratamento com hipoclorito de sódio e, novamente, tratamento com etanol ou água esterilizada. O tempo de exposição dos frutos para cada tratamento e a concentração do hipoclorito de sódio pode variar de acordo com a textura do material a ser utilizado (BATISTA et al., 2018).

Os métodos de isolamento podem ser realizados por meio da distribuição de fragmentos do material sobre a superfície do meio de cultura e da incubação das amostras em condições adequadas por determinado período para o crescimento microbiano. Para testes

quantitativos, as amostras podem ser trituradas e através de suspensões aquosas ou solução salina, nas suas devidas diluições seriada, as amostras são inoculadas em meio de culturas apropriados (SILVA et al., 2005).

O isolamento de uma cultura de microrganismos é realizado através de técnicas de plaqueamento em um meio de crescimento seletivo. O plaqueamento em superfície permite a contagem e o isolamento dos microrganismos que crescem na superfície do meio de cultura, enquanto no plaqueamento em profundidade, a amostra é inoculada em placas de petri vazias, e o meio de cultura é vertido sobre a amostra, homogeneizado e deixado em repouso até sua completa solidificação (LIMA et al., 2020; AMANN et al., 1995). Na Tabela 1 são apresentados alguns microrganismos endofíticos isolados de frutos.

Tabela 1. Isolamento de microrganismos endofíticos de frutos.

Fonte	Microrganismo isolado			Referência
	Bactérias	Fungos	Leveduras	
Achachairu			<i>Candida carpophila</i>	Barros et al., (2019)
Bacaba	<i>Ochrobactrum tricitii</i>		<i>Candida intermedia</i>	Barros et al., (2019)
Araçá-boi			<i>Candida ciferri</i> , <i>Candida carpophila</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i>	Barros et al., (2019)
Morango	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Pseudomona sp.</i> , <i>Pantoea puntacta</i> , <i>Curtobacterium citreum</i>			De Melo et al., (2012)
Goiaba		<i>Cladosporium uredinicola</i>		Medeiros et al., (2012)
Pixirica	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Citrobacter freundii</i>			Dias et al., (2015)
Araçá	<i>Enterobacter sp.</i>			Dias et al., (2015)
Ananás	<i>Microbacterium testaceum</i> , <i>Burkholderia sordicola</i>			Dias et al., (2015)
Jatobá	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Bacillus</i>			Dias et al., (2015)

Os microrganismos endofíticos possuem aplicações na agroindústria, meio ambiente e na biotecnologia. Na agroindústria os endofíticos aumentam a capacidade das plantas de resistir ao estresse abiótico. Fatores como a alta salinidade, baixa umidade e calor, afetam negativamente a fisiologia e morfologia da planta, com isso os endófitos aumentam a biomassa vegetal em oposição às plantas não endófitas, proporcionando maior tolerância à seca, além disso, atuam como agentes de biocontrole contra fitopatógenos (EGAMBERDIEVA et al., 2017; LIU et al., 2017; ADELEKE; BABALOLA, 2021).

Madbouly et al. (2020) isolaram cinco leveduras endofíticas de frutos de maçã saudáveis, identificados como *Schwanniomyces vanrijiae*, *Galactomyces geotrichum*, *Pichia kudriavzevii*, *Debaryomyces hansenii* e *Rhodotorula glutinis*. As leveduras foram testadas quanto ao potencial inibitório de *Monilinia fructigena*, agente causador da podridão parda nos frutos de macieira. Os três primeiros isolados mostraram potencial inibitório considerável em testes realizados *in vitro* e *in vivo*, e causaram uma inibição significativa da germinação de conídios do patógeno em 67,6-89,2%.

Microrganismos endofíticos podem influenciar no crescimento das plantas por meio da transferência de nutrientes. Plantas com fungos endofíticos exibem crescimento superior sobre aquelas sem fungos, isso ocorre devido atividades fúngicas que incluem solubilização de diferentes fontes de fósforo, produção de ácido indolacético e transferência de nutrientes escassos do solo (nitrogênio, fósforo e enxofre) para as plantas hospedeiras (KHAN et al., 2012; KIERS et al., 2011; PRIYADHARSINI; MUTHUKUMAR, 2017).

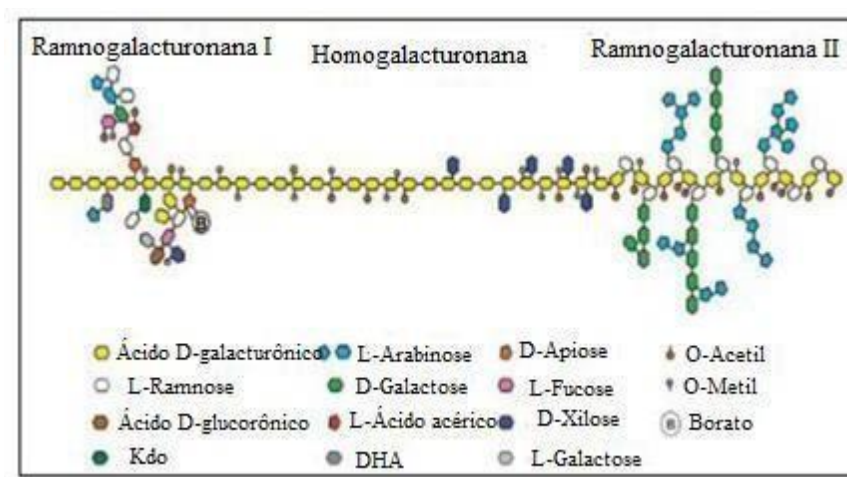
Na biotecnologia os endofíticos são conhecidos pela produção de várias enzimas, como celulasas, esterases, lipases, pectinases, proteases e xilanases. A aplicação dessas enzimas incluem biomateriais, celulose, cosméticos, detergentes, alimentos, couro, papel, produtos farmacêuticos e têxteis (BEZERRA et al., 2012; SUTO et al., 2002; YADAV et al., 2015).

2.3 Enzimas pectinolíticas: classificação e mecanismo de ação

Substâncias pécticas são macromoléculas glicosídicas de alto peso molecular que compõem a maior parte da lamela média das paredes primárias de células de vegetais superiores. Os polissacarídeos da parede celular vegetal são constituídos de celulose,

hemicelulose e pectina. A pectina é composta por resíduos de ácido D-galacturônico, unidos por ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ em uma cadeia linear ou ramificada. Outras unidades de açúcares, como ribose, galactose, arabinose e sacarose, também são encontradas nos polímeros. Cerca de 70% de ácido galacturônico está presente na parede celular (HARHOLT et al., 2010; PICOT-ALLAIN et al., 2020; SHRESTHA et al., 2020, UENOJO; PASTORE, 2007). Os principais polissacarídeos pécicos são homogalacturonana, ramnogalacturonana I e ramnogalacturonana II (Figura 4).

Figura 4. Representação da homogalacturonana, ramnogalacturonana I e ramnogalacturonana II.



Fonte: Scheller et al. (2007)

Homogalacturonana (HG) é o polissacarídeo pécico mais abundante, constituindo cerca de 65 % do total da pectina. É um polímero linear que consiste em uma cadeia principal formada por ácido D-galacturônico, que pode encontrar-se acetilada e/ou metil-esterificada. A HG apresenta diferentes graus de esterificação podem ser totalmente metil-esterificada (pectina), parcialmente metil-esterificada (ácido pectínico) ou isento de metilação (ácido pécico) (VORAGEN et al., 2009; NAIDU; PANDA, 1998; LANG; DÖRNENBURG, 2000).

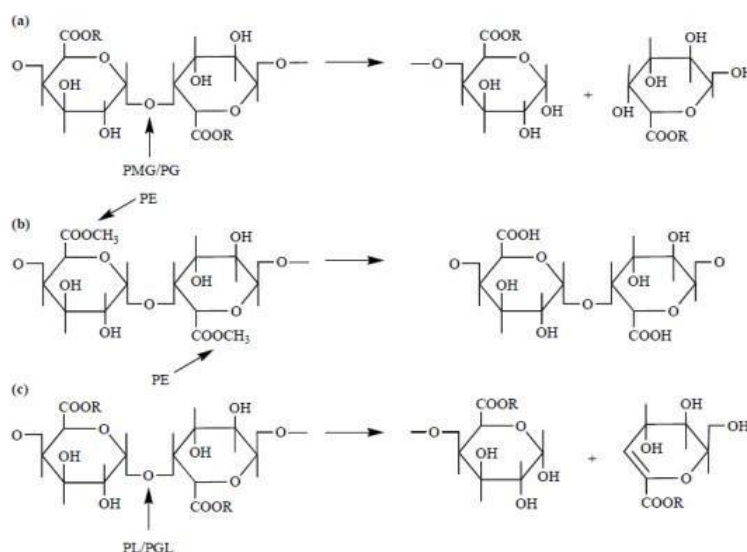
Ramnogalacturonana I (RGI) representa de 20 a 35% do total de pectinas. A RGI apresenta uma cadeia que alterna resíduos de ácido galacturônico com resíduos de ramnose, cadeias laterais de resíduos de açúcares neutros como galactose, arabinose e xilose podem ser encontradas ligadas aos resíduos de galacturonato ou de ramnose (WILLATS et al., 2000; VORAGEN et al., 2009).

Ramnogalacturonana II (RGII) é a pectina mais complexa, representando cerca de 10% do total de pectinas, esse polissacarídeo possui cadeia de homogalacturonana com

cadeias laterais complexas ligadas aos resíduos de galacturonato (VORAGEN et al., 2009; WILLATS et al., 2000).

As enzimas pectinolíticas são um grupo de enzimas que agem sobre os resíduos de ácido galacturônico. Sua classificação é baseada na preferência pelo tipo de substrato (pectina, ácido pécico ou protopectina), pelo rompimento da ligação glicosídica, lise ou hidrólise e pelo seu modo de ação (endoenzima ou exoenzima). Essas enzimas são classificadas em protopectinases, esterases e as despolimerases que incluem as liases (pectina liase e pectato liases) e as hidrolases (poligalacturonases e polimetilgalacturonases) (GUMMANDI; PANDA, 2003; ALKORTA et al., 1998; SAKAI et al., 1992; JAYANI et al., 2005; TAPRE; JAIN, 2014). A figura 5 apresenta como as enzimas pectinolíticas atuam sobre a molécula de pectina conforme sua classificação.

Figura 5. Mecanismo de ação das pectinases. (a): poligalacturonase (PG) e polimetilgalacturonase (PMG); (b): pectinaesterase (PE); e (c): polimetilgalacturonato liase (PGL) e pectina liase (PL). As siglas indicam os locais onde as enzimas reagem com as substâncias pécicas.



Fonte: Pedrolli et al. (2009)

Protopectinases (E.C. 3.2.1.99) são enzimas que atuam na hidrólise da protopectina, originando ácido pécico e pectina. Elas são classificadas em dois tipos, o tipo A responsável pela clivagem na parte interna da molécula do ácido poligalacturônico da protopectina e o tipo

B que cliva a parte externa nas cadeias de polissacarídeos que podem estar conectados às cadeias de ácido poligalacturônico, constituintes da parede celular (JAYANI et al., 2005; ALKORTA et al., 1998).

A protopectinase pode ser obtida de diferentes fungos, leveduras e bactérias, possui atividade ótima dentro da faixa de pH de 3,0 a 6,0 e temperatura de 30 a 40 °C (LANG et al., 2016; ZAPATA- ZAPATA et al., 2017; VASCO-CORREA; ZAPATA, 2017; ZHANG et al., 2018).

Pectinesterases (EC 3.1.1.11): catalisam a desesterificação da pectina por remoção do grupo metoxil das substâncias pécticas, formando ácido péctico. Essa enzima atua de preferência no grupo metil éster da unidade de galacturonato próxima a uma unidade de galacturonato não esterificada (ALKORTA et al., 1998; GAVA, 1998; KAYSHAP et al., 2001). A maioria das esterases atuam em uma ampla faixa de pH (4 a 8) e temperatura (40 °C a 50 °C). Essa enzima está presente em muitas preparações enzimáticas comerciais, melhorando a textura e firmeza de frutas e vegetais processados e na extração e clarificação de sucos de frutas (JAYANI et al., 2005; UENOJO; PASTORE, 2007).

As despolimerases são classificadas em hidrolases que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 e as liases que atuam por transeliminação das ligações glicosídicas. As hidrolases incluem as poligalacturonases e as polimetilgalacturonases. As poligalacturonases (E.C. 3.2.1.15) agem na hidrólise α -1,4 das ligações glicosídicas entre dois resíduos de ácido galacturônico com a introdução de água pela ponte de hidrogênio. Essas enzimas podem apresentar ação endo, quando hidrolisam de forma randômica as ligações entre os resíduos de ácido galacturônico (ácido péctico), liberando oligogalacturonatos, ou ação exo, quando catalisam a hidrólise das cadeias a partir da extremidade não redutora, liberando ácidos monogalacturônicos (BENEN; VISSER, 2003; RESENDE et al., 2004; JAYANI et al., 2005; MUTLU et al., 1999).

As polimetilgalacturonases também catalisam a quebra das ligações glicosídicas α 1 $\rightarrow$ 4 como as poligalacturonases, se diferenciando devido à preferência pelo substrato altamente metoxilado (JAYANI et al., 2005; TAPRE; JAIN, 2014).

A maioria das poligalacturonases possuem um pH ideal para hidrólise variando de 3,5 a 5,5 e temperatura que varia de 30 °C a 50°C. As endopoligalacturonases (E.C. 3.2.1.15) e exopoligalacturonases (E.C. 3.2.1.67) são sintetizadas em condições ambientais ácidas por microrganismos, algumas exopoligalacturonases são produzidas em condições básicas altas (cerca de pH 11) por *Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp e *Fusarium oxysporum* (MUTTER et al., 1998; JAYANI et al., 2005).

As liases (E.C. 4.2.2.10) são enzimas que quebram ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos com uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 do final não redutor do ácido galacturônico formado. Elas são classificadas em pectina liase e pectato liase (KASHYAP et al., 2001).

A Pectina liase age de forma randômica em cadeias altamente esterificadas de pectina, como resultado produz metiloligogalacturonatos insaturados, através de mecanismos de transeliminação de ligações glicosídicas. A pectato liase rompe ligações glicosídicas do ácido poligalacturônico, formando produtos insaturados através de mecanismos de transeliminação (PEDROLI et al., 2009; JAYANI et al., 2005).

A pectina liase possui o pH ótimo de 5,5 e temperatura ótima entre 40 °C e 50 °C, enquanto a pectato liase, atua em pH ótimo alcalino de 7,5 e 10 e temperatura ótima entre 40 °C e 50 °C (SAKAI et al., 1992; JAYANI et al., 2005; ALKORTA et al. 1998).

2.4 Fontes de obtenção de enzimas pectinolíticas

As enzimas podem ser obtidas de diversas fontes, entretanto a maioria é originada de fungos filamentosos, leveduras e bactérias. As enzimas de origem microbiana apresentam um enorme potencial devido à ampla diversidade microrganismos produtores, taxa de crescimento mais rápida, susceptibilidade de manipulação genética e tempo de fermentação mais curto (AMIN et al., 2019, ANISA; GIRISH, 2014).

A maioria dos microrganismos utilizados para a produção de enzimas é de origem fúngica, com mais de 76,5% das patentes, seguido de bactérias com 19,1%. Entre os fungos, o mais utilizado em escala industrial pertence ao gênero *Aspergillus niger*, devido seu status *Generally Recognized as Safe* (GRAS) com 48% das patentes e entre as bactérias, o gênero *Bacillus* detêm 92% das patentes disponíveis (RODRIGUES et al., 2020; AMIN et al., 2019, ANISA; GIRISH, 2014).

A maioria das pectinases bacterianas é produzida pelos gêneros *Bacillus*, *Erwinia*, *Streptomyces* e *Pseudomonas*. Algumas poucas espécies de leveduras são relatadas com potencial para a produção de pectinase, como *Saccharomyces* sp., *Cryptococcus* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula dairenensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Geotrichum klebahnii*, *Wickerhamomyces anomalus* (SOHAIL; LATIF, 2016; ALIMARDANI THEUIL et al., 2011; MERIN et al., 2015; HASSAN; ALI, 2016; NAUMOV et al., 2016). A tabela 2 apresenta diferentes tipos de microrganismos como fonte para a produção de pectinases.

Tabela 2. Fontes microbianas de enzimas pectinolíticas.

Enzima	Microrganismo produtor	Fonte de isolamento	Referência
Pectinase	<i>Streptomyces fumigatiscleroticus</i>	Cascas de frutas	Govindaraji; Vuppu, (2020)
Pectinase	<i>Aspergillus</i> sp.	Amostras de solo	KC et al., (2020)
Pectina metilesterase Endo-poligalacturonase	<i>Pichia pastoris</i>	<i>Sphenophorus levis</i> (gorgulho da cana- de-açúcar)	Habrylo et al.,(2018); Evangelista et al., (2015)
Exo-poligalacturonase	<i>Bacillus pumilus</i>	Amostra de solo	Sharma; Satyanarayana,(2020)
Pectina liase	<i>Bacillus subtilis</i>	Folhas de feijão mungu (<i>Vigna radiata</i>)	Saharan; Sharma, (2019)
Pectinase	<i>Candida</i> sp.	Efluente de indústria têxtil	Aggarwal et al., (2020)
Pectinase	<i>Espécies de Geomyces</i>	Esponjas marinhas	Poveda et al.,(2018)

No trabalho de Mohandas et al. (2018), sete isolados de frutas e vegetais em decomposição foram utilizados para a produção de pectinase. A cepa bacteriana mais eficiente foi identificada como *Bacillus sonorensis* com atividade enzimática máxima de 2,43 ($\mu\text{M}/\text{mL}$)/min. Este trabalho é o primeiro relato sobre a produção de pectinase por *Bacillus sonorensis*.

A obtenção e produção de enzimas microbianas envolvem processos como prospecção, isolamento inicial, identificação dos microrganismos seletivos, triagem através de meios seletivos e o processo de produção por meio de fermentação submersa ou fermentação em estado sólido (OUMER; ABATE, 2018; BHARADWAJ; UDUPA, 2019; SANDRI; SILVEIRA, 2018; GUAN et al., 2020; HASAN et al., 2020).

A produção elevada e viável de enzimas para aplicação comercial exige que condições de fermentação usadas para crescimento de microrganismos e produção de enzimas sejam otimizadas. Os parâmetros ótimos variam dependendo da cepa utilizada, dos parâmetros ambientais e condições nutricionais (SANDRI; SILVEIRA, 2018; KC et al., 2020).

2.5 Aplicações de enzimas pectinolíticas

2.5.2. Extração de compostos bioativos

Os compostos bioativos são metabólitos secundários presentes em pequenas quantidades em alimentos e plantas que trazem benefícios à saúde. Devido as suas propriedades benéficas há um interesse cada vez maior de explorar esses compostos na área de alimentos nutracêuticos e funcionais, produtos farmacêuticos, cosméticos e aditivos alimentares (MARATHE et al., 2019; ACOSTA-ESTRADA et al., 2014, IGNAT et al., 2011; SUN-WATERHOUSE, 2011). Esses compostos incluem: vitaminas insolúveis em água, alguns grupos de corantes alimentares (como carotenóides), antioxidantes (como compostos fenólicos), óleos essenciais e compostos aromáticos (REZAEI et al., 2019).

Os compostos fenólicos possuem propriedades antioxidantes ao eliminar espécies radicais de oxigênio, eles possuem um ou vários ciclos benzênicos. As principais classes são: ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides e lignanas (ASSADPOUR et al., 2019; KATOUIZIAN et al., 2017; MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011). Esses compostos têm efeitos antialérgicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antioxidantes e cardioprotetores (BALASUNDRAM et al., 2006; DAZA et al., 2017; MURADOR et al., 2019).

Os compostos fenólicos podem contribuir na coloração de plantas e bebidas. As antocianinas, por exemplo, são responsáveis pelas cores laranja, vermelho, azul e roxo de muitas frutas e vegetais, além disso, esses compostos também influenciam nas características sensoriais gerais dos alimentos (HAMINIUK et al., 2012).

Os carotenóides são pigmentos encontrados em frutas coloridas e vegetais de folhas verdes. O seu consumo tem sido associado a vários benefícios à saúde, incluindo risco reduzido de degeneração macular relacionada à idade, catarata, doenças coronárias e alguns tipos de câncer (MILANI et al., 2017). Os principais carotenóides incluem o β -caroteno, xantofila, zeaxantina, criptoxantina, licopeno, crocina, capsantina e astaxantina (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, 2019; ZARE et al., 2021).

Os métodos convencionais para a extração de compostos bioativos utilizam basicamente o poder de extração do solvente e o calor aplicado ou sua combinação. Os principais métodos utilizados são a extração de Soxhlet, hidrodestilação e maceração (KHODDAMI et al., 2013). No entanto, esses métodos podem não resultar na recuperação quantitativa do composto alvo, são demorados, usam solventes caros e de alta pureza, além de alto consumo de energia e causam danos ambientais (AZMIR et al. 2013 ; AIRES, 2017).

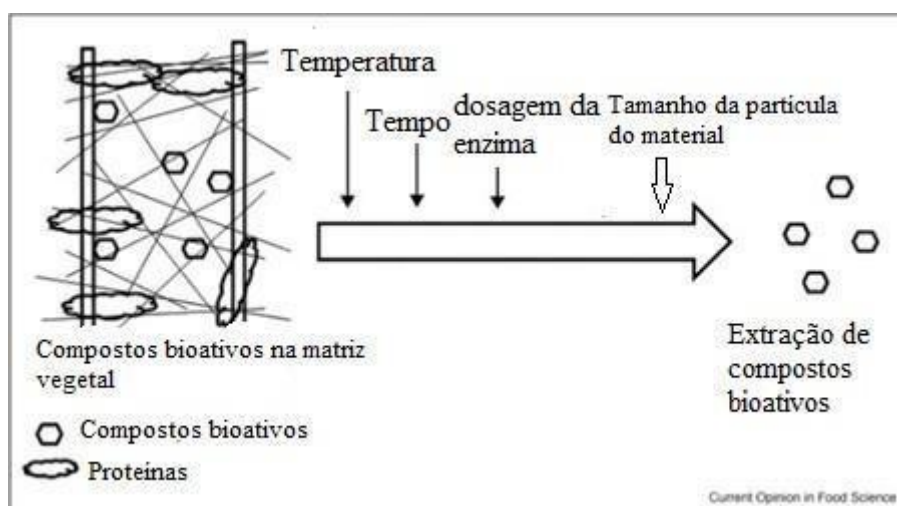
A extração assistida por enzima é um método de tratamento enzimático da matéria-prima realizada antes do processo convencional de extração, este pré-tratamento geralmente reduz o tempo de extração e uso de solventes, além de aumentar o rendimento e a qualidade do produto final (PURI et al., 2012; MERETHI, 2019).

Algumas enzimas usadas para a extração de bioativos incluem celulase, α -amilase, β -glicosidase, xilanase, pectinases e muitas preparações enzimáticas industriais como Viscozyme L (complexo enzimático celulolítico) e Ultrazym (preparação pectinolítica), Pectinex, também são utilizadas (MARATHE et al., 2019).

Na extração enzimática, enzima e substrato se unem para formar um complexo no qual durante o processo, as ligações nas moléculas do substrato se quebram para resultar na formação de produtos. Alguns fatores afetam a interação enzima-substrato como o tamanho do material vegetal, concentração de enzima, tempo de reação, temperatura, pH e razão sólido-líquido (CASAS; DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ, 2017; MARIĆ et al., 2018).

Para uma extração eficiente, esses parâmetros devem ser ajustados para seus valores ótimos, ao considerar o pH ótimo, o ponto isoelétrico deve ser evitado, pois as proteínas são insolúveis nessa faixa e afeta a extração dos bioativos. Com relação à temperatura, temperaturas fora das faixas consideradas ótimas podem reduzir a eficácia na extração de bioativos (NADAR et al., 2018). A Figura 6 apresenta o mecanismo de extração enzimática de compostos bioativos.

Figura 6. Mecanismo de extração enzimática de compostos bioativos.



Fonte: Marathe et al., (2019), adaptado.

As enzimas degradam componentes da parede celular (celulose, hemicelulose e pectina) e permitem a liberação do composto de interesse. A interação entre a enzima e o substrato decide a extensão da hidrólise dessas barreiras e isso pode influenciar na quantidade de bioativos liberados. Portanto para uma extração eficaz é essencial conhecer a composição da parede celular da matéria-prima, bem como a propriedade catalítica, modo de ação e condições ótimas das enzimas (SOWBHAGYA; CHITRA, 2010; PURI et al., 2012).

Ghosh e Biswas (2016), utilizando as enzimas celulase e pectinase na extração de carotenóides de abóbora inteiras sob condições otimizadas, alcançaram um aumento no rendimento de carotenóides em 33,3% (p/p) na amostra tratada com celulase e 28,6% (p/p) na amostra tratada com pectinase. A Tabela 3 apresenta algumas enzimas utilizadas na extração de compostos bioativos.

Tabela 3. Aplicação de enzimas na extração de compostos bioativos.

Enzima	Bioativo extraído	Rendimento	Referência
Celulase e pectinase	Carotenóides de abóbora	Celulase (33,3%) Pectinase (28,6%)	Ghosh; Biswas, (2016)
Pectinase e celulase	Carotenóides totais e licopeno de tomate	Carotenóides (127 mg/kg) Licopeno (89,4 mg/kg)	Strati et al., (2015)
Pectinase, celulase e tanase.	Compostos fenólicos da casca verde de pistache	Pectinase (42%), Celulase (22%), Tanase (51%).	Ghandahari Yazdi et al., (2019)
Poligalacturonase, pectina liase, celulase e xilanase.	Recuperaçãode cromoplastos contendo carotenóides de tomates	Cromoplastos (4,30 mg/Kg), carotenóides totais (5,43 mg/kg)	Lombardelli et al., (2020)

2.5.2 Indústrias de sucos

No processamento de sucos de frutas, a suspensão turva causada pela dispersão coloidal de polissacarídeos (pectina, celulose, hemicelulose, lignina e amido) é um dos principais fatores que causam a perda de qualidade do produto final (DAL MAGRO et al., 2016). Portanto, para eliminar a turbidez e produzir um suco com alto nível de qualidade é necessário que os sucos passem por um processo de clarificação, uma etapa fundamental para a comercialização (SOJITRA et al., 2016; ULLAH et al., 2019).

O processo convencional é realizado por métodos físicos (centrifugação e filtração) e métodos químicos (gelatina, ácido tânico, bentonita, caseína, sílica sol, etc.) (BISWAS et al., 2016; MIRZAAGHAEI et al., 2016; ERKAN-KOÇ et al., 2015).

Apesar de produzir sucos clarificados e estáveis, métodos convencionais possuem algumas desvantagens como baixa recuperação do suco, processo de sedimentação longo e esforços laboriosos. Além disso, alguns agentes químicos levam a perda de compostos fenólicos. Devido a isso, é necessário buscar métodos alternativos que mantenham a qualidade nutricional dos sucos (ERKAN-KOÇ et al., 2015; BAGCI, 2014; STRATI et al., 2015).

O uso de enzimas no processamento de sucos tem ganhado destaque na indústria. A clarificação enzimática aumenta o rendimento, a estabilidade no armazenamento, apresenta um produto final com mais qualidade, é sustentável, além de apresentar alta eficiência catalítica e baixo consumo de energia, com isso, é uma alternativa com grande potencial para substituição de métodos convencionais (SHARMA et al., 2017; LU et al., 2016; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ et al., 2017).

Pectinases, celulasas, hemicelulasas e amilases são enzimas muito aplicadas no processamento de sucos. Dentre essas, as pectinases são as mais utilizadas comercialmente. Essas enzimas atuam na hidrólise da pectina, amolecendo o tecido da parede celular e reduzindo sua capacidade de retenção de água, o que resulta em uma máxima extração do suco, liberação de componentes fenólicos e nutricionais, além de reduzir a viscosidade (ROMERO-CASCALES et al., 2012; PINELO et al., 2010; DANALACHE et al., 2018; VIVEK et al., 2019; SINGH et al., 2016). A tabela 4 apresenta aplicações da enzima pectinase na clarificação de diversos sucos de frutas.

Tabela 4. Enzimas pectinases na clarificação de sucos de frutas.

Enzima	Microrganismo	Suco de fruta Clarificado	Referência
Pectinase	<i>Bacillus subtilis</i>	Amora preta, maçã, laranja e abacaxi	Prajapati et al., (2021)
Poligalacturonase	<i>Calonectria pteridis</i>	Maçã	Ázar et al.,(2020)
Exopoligalacturonase	<i>Penicillium janczewskii</i>	Maçã, manga e pêssego	Amin et al., (2020)
Poligalacturonase	<i>Aspergillus niger</i>	Romã	t Patidar et al., (2020)
Pectinase	<i>Aspergillus sp.</i>	Laranja	KC et al., (2020)
Pectina liase	<i>Aspergillus niger</i>	Maçã, laranja e romã	Portucu et al., (2017)
Pectina liase	<i>Bacillus pumilus</i>	Uva preta, romã, pêssego, maçã e ameixa	Babagil; Nadaroglu (2021)

Ázar et al. (2020), aplicaram uma poligalacturonase produzida pelo fungo *Calonectria pteridis* na clarificação de suco de maçã, como resultado alcançaram um aumento de 10,65% no volume do suco e 40,93% na quantidade de açúcares redutores em relação ao controle. Com relação ao pH, a atividade máxima da poligalacturonase foi alcançada em pH 4,0. Microrganismos que secretam enzimas com faixa de pH ácido são excelentes para aplicação na clarificação de sucos, já que a maioria dos sucos de frutas são ácidos (PATIDAR et al., 2018; ANAND et al., 2017).

Amin et al. (2020) utilizaram uma exo-poligalacturonase obtida de *Penicillium janczewskii* em que aumentou consideravelmente o rendimento e clareza de diferentes sucos de frutas (maçã, manga e pêssego). No suco de maçã a enzima aumentou significativamente o teor de antioxidantes totais (aumento de 95%) e conteúdo fenólico total (aumento de 9%).

2.5.3 Vinhos

A utilização de coquetéis enzimáticos comerciais com atividade de pectinase é muito comum durante o processo de vinificação para quebrar a pectina da parede celular da uva (ALIMARDANI-THEUIL et al., 2011; MERÍN; MORATA DE AMBROSINI, 2015; PRETORIUS, 2000). A tabela 5 apresenta a aplicação de pectinases em vinhos e o resultado da aplicação enzimática.

Tabela 5. Aplicação de pectinases em vinhos e resultados da aplicação.

Enzima	Tipo de vinho	Resultados	Referência
Pectinase (<i>Aureobasidium pullulans</i>)	Uva Malbec	Aumento de antocianinas totais, índice polifenólico total e intensidade de cor e tempos de filtração 30% menores.	Merín; Morata de Ambrosini (2020)
Pectinase (<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Vinho de uva Malbec	Redução de 40% no tempo de filtração e turbidez, realce da cor vermelha (63,2%) e aumento de ésteres totais (45,3 mg/L)	Merín; De Ambrosini (2018)
Pectinex	Vinho tinto de pitaia fermentado com <i>Torulaspora delbrueckii</i>	Aumento de 16% no rendimento de suco/vinho, perfis de compostos de aroma com ésteres e terpenos enriquecidos.	Jiang et al. (2020)

As enzimas são adicionadas durante o processo de esmagamento das uvas ou no mosto de vinho, propiciando melhora na extração do suco, aumentando o conteúdo de terpenos no vinho, melhorando a liquefação, clarificação e filtrabilidade, liberando mais compostos de cor e sabor aprisionados nas cascas das uvas e contribuindo positivamente para o bouquet do vinho (VAN RENSBURG; PRETORIUS, 2000; JAYANI et al., 2005).

Pectinases comerciais com alta atividade de pectina liase e baixa atividade de pectina metilesterase são mais utilizadas industrialmente por minimizarem a liberação de metanol dos ácidos poligalacturônicos metilados durante a produção de vinho (GARG et al. 2016).

A prática de produção de vinhos exige que a pectinase aplicada à fermentação tenha atividade a baixas temperaturas. No processo de fermentação quanto menor a temperatura, melhor para que componentes voláteis do aroma sejam retidos, melhorando as características de sabor do vinho (ROLLER et al., 2015 ; MARTÍN et al., 2019).

No trabalho de Merín e Morata de Ambrosini (2020) foram avaliados os efeitos da cepa pectinolítica *Aureobasidium pullulans* aplicada à maceração pré-fermentativa a frio e fermentação a baixa temperatura, na extração de antocianinas, propriedades tecnológicas e nos atributos sensoriais dos vinhos Malbec. Os vinhos com a cepa pectinolítica apresentaram maiores antocianinas totais, índice polifenólico total e intensidade de cor, além de tempos de filtração 30% menores. Os vinhos apresentaram um aumento de antocianinas monoméricas durante a fermentação e maiores pigmentos poliméricos aos 9 meses de armazenamento em garrafa, sugerindo uma maior estabilidade na cor do vinho.

Nos vinhos de frutas, a pectinase degrada as substâncias pécticas da parede celular, melhorando a extração e clarificação da polpa. Além disso, a enzima causa alterações importantes na cor, aroma, composição química e capacidade antioxidante do vinho de frutas (GUO et al., 2018 , MA et al., 2018 ; SAMOTICHA et al., 2017).

2.5.4 Indústria de ração animal

As pectinases são usadas no coquetel enzimático para a produção de rações para animais. A enzima é adicionada na alimentação animal com o objetivo de eliminar os fatores antinutricionais da pectina e da celulose e liberar os nutrientes, melhorando com isso a digestibilidade do animal em uma ampla faixa, e promovendo a viscosidade do tecido vegetal (JAYANI et al., 2005; AJILA et al., 2012).

A dieta suplementada com coquetel de enzimas (xilanases, pectinases e celulasas), melhora o desempenho animal. Essa melhora pode ser atribuída à digestão da fibra ruminal,

que resulta no aumento da ingestão de energia digestível (ARAMBEL et al., 1987; GHORAI et al., 2009).

2.5.5 Indústria de biorrefinaria

As biorrefinarias são indústrias que possuem uma gama de tecnologias capazes de transformar a biomassa em seus componentes mais simples como proteínas, açúcares, triglicerídeos (MAZZEI et al., 2021).

Enzimas pectinases, celulases e hemicelulases são muito utilizadas em biorrefinarias para degradar polissacarídeos presentes na parede celular de resíduos agroindustriais. Esses resíduos são processados até a redução em açúcares simples para que possam ser convertidos em bioetanol ou usados como açúcares fermentáveis (HOSSAIN et al., 2017, BIZ et al., 2014).

2.5.6 Biolimpeza

No processo de biolimpeza as pectinases atuam removendo ceras e outras impurezas não celulósicas, fornecendo uma superfície mais suave para o algodão. Muitos processos de lavagem alcalina utilizam produtos químicos como hidróxido de sódio, porém o custo total é alto e o processo é realizado em alta temperatura e requer várias lavagens como pós-tratamentos, o que demanda alto consumo de água e energia. Com isso a lavagem enzimática, que é conhecida como bio-limpeza, é um processo eficaz para limpar o tecido sem impacto negativo no meio ambiente ou no tecido (AGGARWAL et al., 2020).

Aggarwal et al. (2020) produziram uma pectinase extracelular termoestável de *Candida* sp. isolada de efluente da indústria têxtil para aplicação na biolimpeza. O extrato enzimático bruto apresentou estabilidade enzimática em uma ampla faixa de temperatura e a atividade foi mantida de 30°C a 90°C, e atingiu um pico máximo em pH 5,5. A lavagem-branqueamento convencional resultou em maior perda de peso (3,9%) em comparação com a biolimpeza enzimática e todas as amostras biolimpas com a enzima apresentaram absorvência instantânea, o que indica a eficiência da lavagem, bem como a adequação do algodão tratado para o tingimento.

Chiliveri e Linga (2014) caracterizaram uma pectato liase que removeu 97,91% de pectina de tecidos de algodão em comparação ao tratamento alcalino apresentando um amplo potencial para aplicação nas indústrias têxteis.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar microrganismos isolados dos frutos amazônicos bacupari, pupunha e tucumã, quanto ao potencial para a obtenção de um extrato enzimático pectinolítico e aplicação na extração de pigmentos.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar microrganismos obtidos da fermentação espontânea dos frutos amazônicos bacupari, pupunha e tucumã;
- Selecionar os microrganismos produtores de enzimas pectinases;
- Caracterizar morfollogicamente e bioquimicamente os microrganismos produtores das enzimas pectinases;
- Identificar as espécies com atividade pectinolítica através de técnicas de biologia molecular;
- Determinar a atividade enzimática do extrato bruto pectinolítico produzido pelos microrganismos;
- Determinar a temperatura e pH ótimo da atividade pectinolítica do extrato bruto;
- Aplicar o extrato bruto pectinolítico na extração de carotenóides em tomate.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido como parte do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica na Amazônia PROCAD-AM 1707/2018 (Processo nº 88881.200497/2018-01).

4.1 Coleta dos frutos e fermentação

Coleta dos frutos: Os frutos pupunha e tucumã foram adquiridos em feiras locais, a pupunha na cidade de Conceição do Araguaia-PA e o tucumã em Manaus-AM, o bacupari foi adquirido de produtores rurais na cidade de Aurora do Tocantins-TO. Os frutos foram armazenados em caixas térmicas sanitizadas e transportados ao Laboratório de Microbiologia

Aplicada da Universidade Federal do Tocantins, campus Palmas/TO. Os frutos bacupari (*Garcinia gardneriana*) pupunha (*Bactris gasipaes*), tucumã-do-Brasil (*Astrocaryum vulgare* Mart) foram armazenados em temperatura ambiente com o objetivo de manter a microbiota presente inalterada.

Limpeza e sanitização dos frutos: Realizou-se primeiramente a seleção dos frutos, sendo retirados os que possuíam lesões, após isso foram sanitizados com solução de hipoclorito 50 ppm por 15 minutos para a remoção das sujidades grosseiras, sendo em seguida lavados em água destilada esteril.

Fermentação espontânea dos frutos: Para cada fruto foram utilizados seis sacos plásticos (polietileno- 150 x 200 mm) esterilizados contendo cerca de 100 gramas dos frutos integrais (cascas, polpas e sementes) macerados. A fermentação espontânea ocorreu durante um período de 15 dias a 30 °C em estufa bacteriológica (Modelo Olidef cz) e foi monitorada por meio de coletas de amostras para análises microbiológicas.

4.2 Isolamento dos microrganismos

A coleta dos frutos em fermentação (10 g de amostra) foi realizada de forma asséptica, as amostras foram transferidas para frascos erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina peptonada estéril [0,85% (p/v) de cloreto de sódio e 0,1% (p/v) de peptona bacteriológica]. As amostras foram agitadas em mesa agitadora orbital durante 15 minutos a 130 rpm. Posteriormente, sucessivas diluições seriadas foram realizadas e 100 µl de amostra foram inoculados e espalhados na superfície de placas de petri (200 x 15 mm) contendo diferentes meios de cultura. Os meios de cultivo utilizados para o isolamento foram caldo lisogênico (Luria Bertani Broth) (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCL) e MacConkey (Kasvi). As placas inoculadas foram incubadas a 30 °C em estufa bacteriológica por 2 dias. O isolamento foi realizado em intervalos de 0, 72, 144, 216, 288 e 360 horas de fermentação.

Após completo isolamento dos microrganismos, os mesmos foram preservados em criotubos contendo glicerol a 20% (m/v). Os isolados foram mantidos em ultrafreezer a -80 °C, até o momento da reativação, a qual foi feita retirando a amostra do criotubo com o auxílio de uma alça descartável estéril inoculando-a em placa de Petri, contendo LB sólido. Os isolados permaneceram incubados a 30 °C por 48 horas.

Os microrganismos foram codificados de acordo com o meio do qual foram isolados, sendo o PPLB da pupunha isolada em meio LB, PPMK da pupunha isolada em meio MacConkey, TCLB do fruto tucumã isolado em meio LB, TCMK do fruto tucumã, isolado do meio MacConkey, BCLB fruto do bacupari isolado em meio LB e BCMK fruto do bacupari isolado em meio MacConkey.

4.3 Seleção dos microrganismos produtores de pectinases

4.3.2 Triagem de microrganismos pectinolíticos em placa

As atividades pectinolíticas foram avaliadas em meio mineral (MM) adicionado de 1% de pectina cítrica (m/v), 1,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g/L de KH_2PO_4 , 0,2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,5 g/L de Na_2HPO_4 , 1 g/L de extrato de levedura, 1,5% de ágar (m/v), o pH final foi ajustado para 7,0 utilizando hidróxido de sódio (NaOH) 1M. (SOARES et al., 1999). O meio foi esterilizado a uma temperatura de 121 °C durante 15 minutos.

As placas foram incubadas por 48 h a 30 °C, após este período, a produção das enzimas foi evidenciada através da observação de halos de hidrólise seguindo a metodologia proposta por Soares et al. (1999). As placas foram coradas durante 10-15 min com uma solução contendo 1 g de Iodina e 5 g de iodeto de potássio dissolvidos em 330 mL de água destilada.

Os isolados com colônias apresentando zonas claras (amarelas) foram considerados potenciais produtores de pectinase. Os microrganismos isolados produtores de pectinase foram preservados em criotubos contendo glicerol a 20% (v/v), sob congelamento a -80 °C.

4.3.3 Triagem de microrganismos pectinolíticos em cultivos submersos

Os microrganismos que apresentaram zonas claras em MM sólido com pectina foram submetidos a cultivos submersos realizados em frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 20 mL de MM com pectina, como proposto por Soares et al. (1999), com modificações, assim como foi descrito no item 3.3.1 (Material e Métodos). O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1M e o meio foi esterilizado a uma temperatura de 121 °C por 15 minutos.

Culturas estoques das linhagens potenciais produtoras de pectinase foram transferidas para placas Petri contendo LB sólido, por até 48 h. Colônias isoladas posteriormente foram transferidas para 20 mL de LB durante 24 h, a uma agitação de 150 rpm

e 30 °C, para que fosse atingida uma densidade óptica mínima de 0,60, em um comprimento de onda de $\lambda = 610$ nm, o qual corresponde a um mínimo de 10^7 UFC/mL. Deste cultivo foram utilizados volumes de 2 mL para inocular 18 mL de MM, sendo mantidos a 150 rpm a 30 °C, por 48 horas. O extrato enzimático obtido do cultivo foi centrifugado a 3.000 rpm por 30 minutos, a 10 °C. O sobrenadante foi utilizado para quantificar a atividade da pectinase. Todos os cultivos foram realizados em duplicata.

4.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática consiste na determinação de açúcares redutores produzidos como resultado da hidrólise enzimática da pectina pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), segundo Miller (1959). Para o ensaio enzimático, 800 µL de uma solução de pectina cítrica a 1% em tampão McIlvaine pH 5,0 foi colocada em tubos de ensaio. Os tubos foram mantidos a 50 °C por 5 minutos e só então foram adicionados 200 µL do extrato enzimático. Em diferentes intervalos de tempo (0 e 5 minutos) retirou-se 200 µL da reação, adicionando-os em tubos contendo 200 µL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Todos os tubos de ensaio foram colocados em banho-maria em ebulição (100 °C) por 5 minutos, juntamente com uma solução de referência, a qual consistiu em tubo contendo o meio reacional e 200 µL de água destilada em substituição do extrato enzimático.

Após arrefecimento em banho de gelo, foram adicionadas 2 mL de água destilada. As leituras da atividade foram realizadas em espectrofotômetro com absorbância de 540 nm, utilizando-se ácido galacturônico como padrão.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido galacturônico por mililitro por minuto de reação. A atividade enzimática foi realizada em duplicata.

4.4.1 Análise estatística da atividade enzimática

Para tratamento dos dados foi utilizado a ANOVA (Teste de Tukey) para verificar se houve diferença significativa entre os resultados da atividade enzimática. A análise estatística foi realizada utilizando o software Sisvar versão 5.8 (FERREIRA, 2014).

4.5 Caracterização dos microrganismos produtores de pectinases

4.5.1 Caracterização morfológica e bioquímica

As linhagens isoladas com a capacidade de produção de pectinases foram caracterizadas pela técnica de coloração de Gram, morfologia celular e testes de catalase e oxidase.

4.5.2 Coloração de Gram

A técnica foi realizada a partir de esfregaços de células fixados pelo calor em uma lâmina, onde adicionou-se uma solução de cristal violeta a qual permaneceu em contato com a lâmina por 60 segundos, seguido da adição do reagente lugol por também 60 segundos. Depois, lavou-se a lâmina com água destilada e em seguida com uma solução álcool-acetona. Após lavar-se com água corrente, adicionou-se uma solução de safranina por 30 segundos.

Por fim, retirou-se o excesso de corante com água, secou-se a lâmina com papel filtro e a mesma foi analisada ao microscópio óptico em óleo de imersão. Microrganismos com coloração azulada foram considerados gram-positivos, enquanto aqueles com coloração avermelhada gram-negativos (PELCZAR, 1996).

4.5.3 Morfologia celular

As bactérias foram analisadas segundo a morfologia celular, quanto à forma e arranjo de colônias, além da presença de esporos, seguindo Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (HOLT et al., 1994).

4.5.4 Teste de Catalase

O teste de catalase foi realizado com a adição de uma gota de peróxido de hidrogênio sobre colônias isoladas após 24 h de incubação. As linhagens bacterianas que liberam bolhas são consideradas catalase positivas e as outras, cuja liberação não é evidenciada, catalase negativa (MAC FADIN, 1976).

4.5.5 Teste de Oxidase

O teste de oxidase, o qual verifica a presença da enzima citocromo oxidase, foi realizado através da transferência de células em um palito estéril para uma tira de papel imersa no reagente tetrametil-p-fenilenodiamina.

As linhagens oxidase positiva apresentam cor púrpura-azulada, enquanto linhagens oxidase negativa não se coram ou apresentam cor amarelada (MAC FADIN, 1976).

4.6 Identificação Molecular

A extração de DNA foi realizada usando o kit de extração de DNA illustra™ PHYTOPURE™ de acordo com as instruções do fabricante. A amplificação por PCR foi realizada utilizando o kit PCR Master Mix (Ludwig Biotec, Brasil). As reações foram realizadas em termociclador automático (Bio-rad T100 Thermal Cycler, Estados Unidos). Os primers usados para identificar isolados bacterianos por sequenciamento do gene 16S rRNA foram 27f (5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3') e 1512r (5' - ACG GCT ACC TTG TTA CGA CT - 3'), de acordo com Wang et al. (2006).

A desnaturação inicial do DNA foi realizada a 95 °C por 10 min, seguida por 25 ciclos de desnaturação a 93 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 1 min, alongamento a 72 °C por 1 min 30 s e então uma etapa de alongamento final a 72 °C por 5 min.

O primer usado para identificar o isolado de levedura por sequenciamento da região ITS1–5.8S rDNA – ITS2 foram ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5' -TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') de acordo com Masoud et al. (2004). A desnaturação inicial do DNA foi realizada a 95 °C por 3 min, seguida por 35 ciclos a 95 °C por 30s, anelamento a 56 °C por 30 s, alongamento a 72 °C por 30 s e um alongamento final a 72 °C por 7 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (Ludwig Biotec, Brasil) a 80 V, por 1 h.

O marcador molecular HighRanger 1 kb DNA Ladder (NORGEN Biotek Corporation, Canadá) foi utilizado como padrão para reconhecimento do peso molecular das bandas obtidas. Os fragmentos amplificados foram visualizados pelo corante Safer Dye 6x Loading Buffer (KASVI, Brasil) e transiluminação UV (L.PIX Loccus Biotecnologia, Brasil). Os produtos amplificados foram purificados usando o kit PCR Products Purification Kit (MEBEP Bioscience, China). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados por ACTGene (Brasil) usando um sequenciador Applied Biosystems® Sanger Sequencing 3500 Series Genetic Analyzers (ThermoFischer Scientific, Estados Unidos). As sequências parciais obtidas do gene 16S rRNA e região intergênica ITS1 –5.8S rDNA – ITS2 foram analisadas

através do software BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.5.3. As sequências obtidas para cada linhagem foram comparadas com o banco de dados GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando a ferramenta BLASTn para a identificação das linhagens bacterianas e de leveduras.

4.7 Propriedades Bioquímicas das Pectinases Produzidas

4.7.1 Determinação da temperatura ótima e pH ótimo da atividade enzimática

A temperatura ótima da atividade enzimática foi determinada em banho-maria nas temperaturas de 20 a 60 °C, com intervalos de 5 °C. O pH ótimo da atividade enzimática foi determinado em tampão Tris-HCL (1,0-1,5) e tampão McIlvane (2,0 a 8,0), com intervalos de 0,5. A determinação da atividade foi realizada conforme descrito anteriormente no item 4.4.

4.8 Tratamento Enzimático para a extração de carotenóides

O extrato enzimático produzido foi avaliado quanto ao potencial para a extração de pigmentos carotenóides em tomate. Para o tratamento enzimático foram realizados testes com os 45 microrganismos positivos para pectinase. Os tomates foram comprados em comércio local, lavados com água e após isso macerado manualmente com auxílio de almofariz e pistilo.

O tratamento enzimático foi realizado de seguindo a metodologia de Macedo et al. (2015), com adaptações. Foram pesados 25 g de tomate e adicionou-se um volume de 50 mL de preparação enzimática, que continha 4 U de extrato enzimático liofilizado reconstituído em água destilada com 0.05% de azida sódica. As amostras foram colocadas em Erlenmeyers de 125 mL envolvidos com papel alumínio e incubadas em shaker a 30 °C a 150 rpm por 24 horas. Após isso, a mistura foi filtrada em bquer envolto de papel alumínio, filtrado com papel filtro.

4.8.1 Análise de Carotenóides

A concentração de carotenóides totais foi determinada pelo método espectrofotométrico seguindo metodologia de Higby (1962). Foram retiradas 10 mL de cada uma das amostras, a extração foi realizada com solução álcool isopropílico: hexano (3:1). O

conteúdo foi transferido para um funil separador de 125 mL envolto de papel alumínio, agitou-se o funil e após a agitação foram realizadas lavagens com água destilada. Após a lavagem retirou-se a fase de cor amarela. O conteúdo foi filtrado com algodão pulverizado com sulfato de anidro P.A. em um balão volumétrico de 50 mL envolto em papel alumínio, lavou-se o algodão com hexano para a retirada de todo o pigmento do algodão, adicionou-se 5 mL de acetona e aferiu-se o balão volumétrico com hexano.

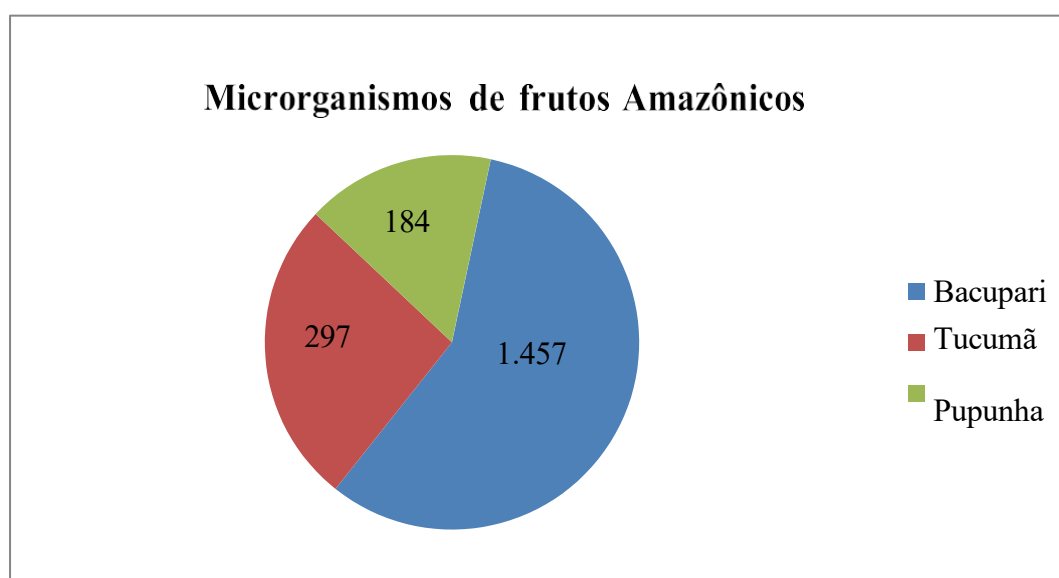
A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 450nm feita a leitura contra um branco para zerar o equipamento que consistia em uma mistura de álcool isopropílico e hexano, expressou-se o resultado em porcentagem em relação à amostra controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de microrganismos

Os resultados do isolamento de microrganismos dos frutos bacupari, tucumã e pupunha estão expostos na Figura 7. Foram isolados um total de 1 . 9 3 8 colônias dos frutos em condição de fermentação espontânea. Destas colônias, 1.457 correspondem ao fruto bacuparique apresentou o maior número, seguido do tucumã com 297 e a pupunha com 184 colônias isoladas.

Figura 7. Colônias isoladas dos frutos amazônicos bacupari, tucumã e pupunha em fermentação espontânea.



O bacupari apresentou a maior quantidade de microrganismos, isso pode ser devido aos teores de açúcares presente na polpa do fruto. O bacupari possui 24,19% de açúcares, enquanto a pupunha e tucumã possuem baixo teor de açúcares. Os açúcares aumentam com o avanço da maturação do fruto e são responsáveis pela doçura, sabor e textura dos frutos (NERI-NUMA et al., 2018 , ORDÓÑEZ-SANTOS et al., 2015 , ROJAS-GARBANZO et al., 2012; YUYAMA et al., 2008; MARQUES et al., 2017 ; SCHNEIDER et al., 2020; FREIRE et al., 2000; SILVEIRA et al., 2009; CHITARRA; CHITARRA, 2005).

A quantidade de microrganismos presentes em frutos está relacionada a fatores intrínsecos, como a composição nutricional (açúcares, vitaminas, minerais e aminoácidos) que proporciona um ambiente ideal para a sobrevivência e crescimento de muitos microrganismos e fatores extrínsecos como condições climáticas, colheita, pássaros, insetos e polinizadores (DROBY et al., 2016; FESSARD; REMIZE, 2019; RODRÍGUEZ et al., 2019).

Miguel et al. (2017) isolaram um total de 873 colônias de grãos de cacau. O total de 445 cepas foram isoladas da fermentação espontânea e 428 cepas da fermentação inoculada com *Lactobacillus fermentum*. O processo de fermentação espontânea de grãos de cacau apresentou maior variedade de espécies em comparação com as fermentações inoculadas.

No trabalho de Dias et al. (2015) um total 600 colônias foram isoladas de 32 frutos nativos do Cerrado. A análise das sequências do gene 16S rRNA de 69 representantes do perfil mostrou que os isolados pertenciam a 29 gêneros bacterianos. As bactérias foram testadas quanto à capacidade de produzir celulase e 178 (30%) dos isolados foram capazes de produzir a enzima. Os melhores produtores pertenciam aos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Enterobacter* e *Burkholderia*.

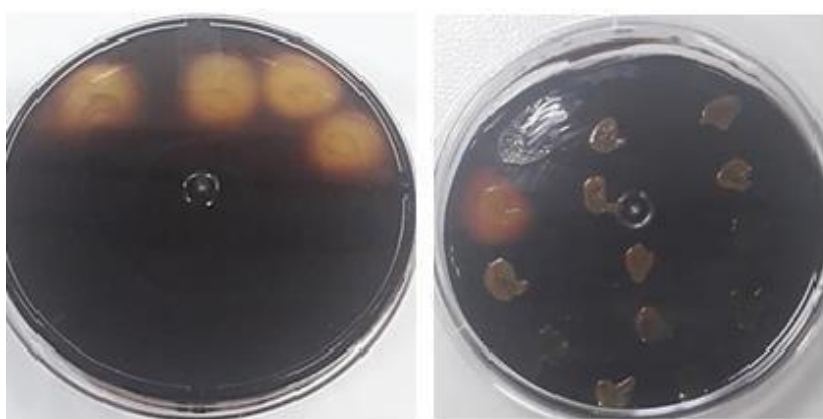
Os frutos apresentam uma fonte promissora para obtenção de microrganismos capazes de sintetizar diversas enzimas, como celulases, invertases, lipases, pectinases, entre outras. Dessa forma, as linhagens isoladas nesse trabalho foram avaliadas quanto ao potencial para produção de pectinases.

5.2 Triagem de microrganismos pectinolíticos em placa

Na triagem de microrganismos pectinolíticos em placas, quando a pectina é utilizada como única fonte de carbono, o microrganismo cultivado nesse meio hidrolisará a pectina tornando-a incapaz de se ligar ao iodo, formando um complexo. Como resultado, essa área

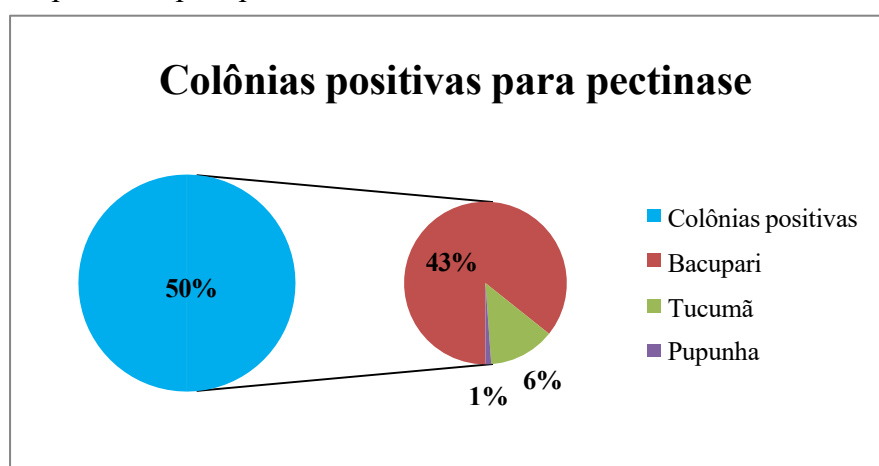
permanecerá clara (Figura 8). A partir das zonas claras pode-se facilmente identificar se as colônias têm ou não atividade de pectinase (MOHANDAS et al., 2018; SHRESTHA et al. 2021; PRIYA; SASHI, 2014, HAILE; KANG, 2019; MERCIMEK TAKCI; TURKMEN, 2016).

Figura 8. Triagem em placa da atividade de pectinase de isolados do bacupari, apresentando zonas claras após aplicação de solução reveladora de iodo como indicativo de produção de enzima.



Entre as 1.938 colônias isoladas, 175 apresentaram zona clara ao redor da colônia, sendo 150 (43%) do bacupari, 23 (6%) do tucumã e 2 (1%) da pupunha, como indicação da sua capacidade de hidrolisar a pectina, sendo considerados possíveis produtores da enzima (Figura 9).

Figura 9. Colônias isoladas dos frutos bacupari, tucumã e pupunha que apresentaram resultados positivos para pectinase.



É importante ressaltar que a produção de halo ao redor da colônia é apenas um indicativo de possível produção enzimática, alguns fatores podem influenciar na ausência ou presença da enzima utilizando triagem em meio sólido, como baixa produção de enzima, baixa difusão da enzima no meio de cultura, baixa sensibilidade dos métodos de detecção e interferência de outras substâncias presentes no meio que podem ocasionar resultados positivos pela reação com os corantes (SANOMIYA; NAHAS, 2003; MACCHERONI JR et al., 2004; VASCONCELOS et al., 2003; COLEN, 2006).

Shrestha et al. (2021) isolaram 29 microrganismos para a produção de pectinase, dos 29 isolados, 17 (58,62%) produziram uma zona de halo ao redor das colônias e foram considerados com propriedades pectinolíticas. Em estudo realizado por Haile e Kang (2019) um total de 28 leveduras foram isoladas durante a fermentação do café. Dentre as leveduras isoladas, 8 (22%) apresentaram atividade pectinolítica após testadas em meio YPDA enriquecido com pectina cítrica.

Segundo Pereira (2012) a avaliação qualitativa da produção de enzimas, muitas vezes, não corresponde à produção real, portanto é necessária a análise quantitativa para a avaliação correta, com isso uma triagem secundária em cultivo submerso foi realizada para a produção do extrato enzimático e posteriormente a confirmação da atividade da pectinase.

5.3 Triagem de microrganismos pectinolíticos em cultivos submersos

Para validar a presença de pectinases e produzir o extrato enzimático, os 175 isolados foram submetidos a um cultivo submerso por 48 horas a 30 °C sob agitação constante de 150 rpm (Figura 10).

Figura 10. Cultivo submerso das linhagens de microrganismos isolados de frutos de bacupari para a produção de enzimas pectinolíticas.



O cultivo submerso é um caldo líquido com nutrientes e oxigênio adequados para o desenvolvimento de microrganismos (JHON et al., 2020; ZOU et al., 2014; MENEGHEL et al., 2014; GERVAIS; MOLIN, 2003).

As condições utilizadas para o cultivo estão de acordo com a literatura, Ibrahim et al. (2015) ao analisarem a velocidade de agitação na produção de pectinase por *Aspergillus niger*, alcançaram atividades máximas da enzima (1,56 U/mL) com uma velocidade de agitação mantida a 150 rpm. Em seu estudo, Arekemase et al. (2020) alcançaram maior atividade enzimática (1,34 U/mL) para a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* em 48 h de fermentação, incubação maior que 72 h resultou em uma queda da atividade, possivelmente devido ao esgotamento dos nutrientes disponíveis (PHUTELA et al., 2005; FLORES et al., 1997).

Entre os 175 microrganismos avaliados quanto à atividade enzimática, 45 se mostraram produtores de pectinases (Tabela 6). A maior atividade de pectinase foi observada para a linhagem BCLB 285 isolada do fruto bacupari (1,38 U/mL), sendo que as linhagens TCMK 112, BCLB 413, BCLB 533, BCLB 580 A e BCLB 160 B apresentaram valores entre 0,8 e 0,97 U/mL. Valores intermediários (0,4 – 0,8 U/mL) para a produção de pectinase foram observados para 18 linhagens isoladas dos frutos de pupunha, tucumã e bacupari. As menores produções de enzimas foram observadas para 21 linhagens microbianas (0,1 – 0,4 U/mL).

Tabela 6. Quantificação da atividade enzimática em cultivo submerso dos 45 microrganismos produtores de pectinase.

Linhagem	Atividade enzimática (U/mL)	Linhagem	Atividade enzimática (U/mL)	Linhagem	Atividade enzimática (U/mL)
BCLB 285	1,38±0,11	BCLB 802	0,49± 0,05	BCLB 138	0,30±0,05
TCMK 112	0,97±0,17	BCLB 151 B	0,48± 0,08	BCLB 310	0,30±0,05
BCLB 413	0,90±0,00	BCLB 714	0,48± 0,06	BCLB 143	0,26± 0,03
BCLB 580 A	0,86± 0,12	BCLB 822	0,47±0,02	BCLB 179	0,26± 0,04
BCLB 533	0,81± 0,07	BCLB 619	0,46± 0,01	BCMK 549	0,26± 0,02
BCLB 160B	0,80± 0,00	BCLB 11	0,43±0,05	TCLB 85	0,23±0,04
TCMK 105	0,65±0,05	BCLB 785	0,43± 0,05	BCLB 617 B	0,23± 0,02
BCLB 151 A	0,63± 0,01	BCLB 553	0,41± 0,01	BCLB 270	0,22±0,03
BCLB 547	0,63± 0,07	BCLB 841	0,37± 0,00	TCMK 109	0,21± 0,01
PP 38	0,56± 0,02	TCLB 25	0,35±0,05	BCLB 580 B	0,20±0,02
BCLB 160A	0,55± 0,00	BCLB 24	0,34± 0,00	TCMK 73	0,18± 0,02
BCLB 85	0,50±0,06	PP 24	0,33 ± 0,04	BCLB 197 B	0,14±0,02
BCLB 521 B	0,50±0,02	BCLB 800	0,33±0,04	BCLB 319	0,12±0,02
BCLB 197A	0,49± 0,07	BCLB 225	0,32± 0,05	BCLB 122	0,11±0,01
BCLB 636	0,49±0,01	BCLB 617 A	0,31± 0,00	BCLB 640	0,11±0,02

Os valores são médias ± desvio padrão de duplicatas.

5.4 Análise estatística

A análise de variância (Tabela 8) e teste de Tukey (Tabela 9) foi realizada para as médias do ensaio de atividade enzimática. A análise mostrou que houve diferença significativa nas atividades enzimáticas. O teste de Tukey permitiu verificar a diferença entre as médias da análise, não havendo, portanto, diferença significativa entre as médias do isolado BCLB 640 (0,11 U/mL) ao isolado BCLB 800 (0,33 U/mL).

Com o teste de Tukey foi possível definir isolados com valores intermediários de atividade que partiram do isolado BCLB 24 (0,34 U/mL) até o isolado TCMK 105 (0,65 U/mL). Além disso, é possível observar que há um grupo com maior valor para atividade enzimática como os isolados BCLB 160 B (0,80 U/mL), BCLB 533 (0,81 U/mL), BCLB 580 AO (0,86 U/mL), BCLB 413 (0,90 U/mL) e TCMK 112 (0,97 U/mL). Por fim, verifica-se que o isolado BCLB 285 (1,38 U/mL) foi individualmente superior aos demais isolados a um nível de 0,05% de significância.

Tabela 7. Análise de variância das atividades enzimáticas obtidas das linhagens isoladas dos frutos amazônicos.

Fontes Variáveis	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado	p
N1	45	5.859292	0.130206	43.796	0,00
Erro	46	0.136761	0.002973		
Total corrigido:	91	5.996053			
Coeficiente de variação (%)		12.16			
Média Geral		0.4484807			
Número de observações		92			

Tabela 8. Teste de tukey das atividades enzimáticas obtidas das linhagens isoladas dos frutos amazônicos.

Tratamentos	Médias	Resultados dos Testes*
BCLB 640	0.110533	a
BCLB 122	0.118428	ab
BCLB 319	0.126323	abc
BCLB 197 B	0.142113	abc
TCMK 73	0.189484	abcd
BCLB 580 BB	0.205275	abcde
TCMK 109	0.213170	abcde
BCLB 270	0.228960	abcde
TCLB 85	0.236855	abcdf

BCLB 617 BP	0.236855	abcdef
BCLB 143	0.260541	abcdefg
BCMK 549	0.268436	abcdefgh
BCLB 179	0.268436	abcdefgh
BCLB 310	0.307912	abcdefghi
BCLB 138	0.307912	abcdefghi
BCLB 617 AG	0.315807	abcdefghi
BCLB 225	0.323702	abcdefghij
PP 24	0.331598	abcdefghij
BCLB 800	0.331598	abcdefghij
BCLB 24	0.347388	bcdefghijk
TCLB 25	0.355283	cdefghijk
BCLB 841	0.378969	defghijk
BCLB 553	0.418445	defghijkl
BCLB 785	0.434235	efghijklm
BCLB 11	0.434235	efghijklm
BCLB 619	0.465816	fghijklm
BCLB 822	0.473711	ghijklm
BCLB 151 B	0.489501	ghijklm
BCLB 714	0.489501	ghijklm
BCLB 197 A	0.497396	hijklm
BCLB 636	0.497396	hijklm
BCLB 802	0.497396	hijklm
BCLB 85	0.505292	ijklm
BCLB 521 BB	0.505292	ijklm
BCLB 521 AO	0.513187	ijklm
BCLB 160 A	0.552663	jklm
PP 38	0.568453	klm
BCLB 547	0.639510	lmn
BCLB 151 A	0.639510	lmn
TCMK 105	0.655300	mn
BCLB 160 B	0.805309	no
BCLB 533	0.813204	no
BCLB 580 AO	0.860575	no
BCLB 413	0.900051	p
TCMK 112	0.979003	p
BCLB 285	1.389552	q

*Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade ($p > 0,05$).

5.5 Caracterização dos microrganismos produtores de pectinases

A partir das atividades enzimáticas dos isolados, os microrganismos foram analisados quanto às características morfológicas das colônias (Tabela 9). Em relação à forma das colônias, 32 (71%) apresentaram-se no formato circular, 9 (20%) irregular e 4 (9%) puntiforme. Na elevação das colônias, 22 (49%) foram convexas, 19 (42%) elevadas e 4

(9%) apresentaram elevação protuberante. No quesito margem, 39 (87%) possuíam a margem inteira, 5 (11%) ondulada e apenas 1 (2%) colônia apresentou uma margem elevada. Sobre o tamanho das colônias, 30 (67%) foram definidas como médias, 8 (18%) como pequenas e 7 (15%) como grandes. Quanto à superfície, 43 (96%) dos isolados evidenciaram uma superfície lisa enquanto apenas 2 (4%) rugosa. Quanto à aparência, 34 (76%) foram classificadas como brilhantes e 11 (24%) sem brilho. Sobre a opacidade, a maioria das colônias, 30 (67%) apresentou-se opaca e 15 (33%) translúcida. Com relação à pigmentação, a maioria dos isolados, 27 (60%) possuíam colônias brancas, 13 (29%) amarelas e 5 (11%) coloração creme.

Tabela 9. Caracterização morfológica das colônias produtoras de pectinases.

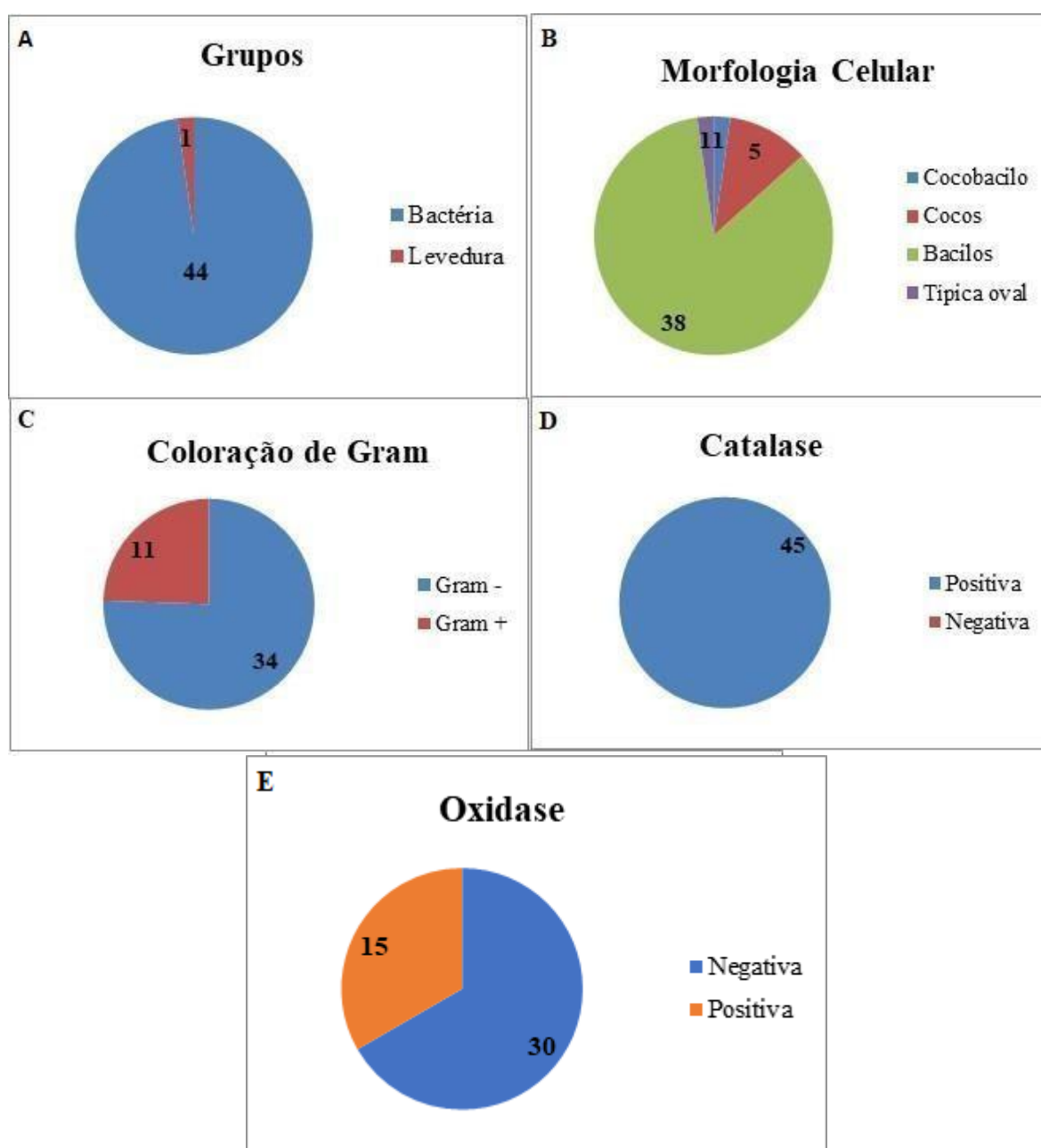
Caracterização morfológica das colônias produtoras de pectinases	
Forma	32 (71%) circular, 9 (20%) irregular e 4 (9%) puntiforme.
Elevação	22 (49%) convexas, 19 (42%) elevadas e 4 (9%) protuberante.
Margem	39 (87%) inteira, 5 (11%) ondulada e 1 (2%) elevada
Tamanho	30 (67%) médias, 8 (18%) pequenas e 7 (15%) grandes.
Superfície	43 (96%) lisa e 2 (4%) rugosa
Aparência	34 (76%) brilhantes e 11 (24%) sem brilho
Opacidade	30 (67%) opaca e 15 (33%) translúcida.
Pigmentação	27 (60%) brancas, 13 (29%) amarelas e 5 (11%) creme

Na Figura 11 são apresentados os resultados da caracterização morfológica dos microrganismos, no qual é possível observar que 44 (98%) dos isolados são bactérias e apenas 1 (2%) foi identificado como levedura. Com relação à morfologia celular, 38 (85%) apresentaram-se no formato de bacilos, 5 (11%) cocos, 1 (2%) cocobacilo e 1 (2%) levedura no formato típica oval.

Entre os isolados apenas 1 levedura foi obtida (BCLB 617 B) e apresentou atividade pectinolítica de 0,23 U/mL. Poucas espécies de leveduras são utilizadas na produção de pectinases, Poondla et al. (2015) avaliaram pectinases da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizando como substrato resíduos agroindustriais em diferentes fontes de carbono e nitrogênio. As maiores produções foram obtidas utilizando casca de laranja e amendoim (6,285 U/mL).

Os resultados dos testes bioquímicos para coloração de Gram expostos na figura 11 demonstram que a maioria dos isolados, 34 (76%) revelou-se Gram negativo e 11 (24%) Gram positivo. Na análise de catalase, todos os 45 (100%) isolados apresentaram catalase positiva. Com relação à oxidase 30 (67%) expressaram oxidase negativa e 15 (33%) oxidase positiva.

Figura 11. Caracterização morfológica dos isolados da pupunha, tucumã e bacupari. Legenda: A grupos microbianos; B morfologia celular; C coloração de Gram; D catalase; E teste de oxidase.



5.6 Identificação molecular

Os isolados dos frutos foram identificados utilizando ferramentas moleculares baseadas nas sequencias parciais de 16S rRNA, para bactérias, e região intergênica ITS1–5.8S rDNA – ITS2, para leveduras. A concentração de DNA puro variou de 35,3 ng/μl a 1851,8 ng/μl (Tabela 6). De 45 isolados, 44 foram confirmados como bactérias e 1 foi confirmado como levedura. Os produtos de PCR foram purificados e suas concentrações estão listadas na Tabela 10.

Tabela 10. Análise de extração de DNA

Isolados	Concentração de DNA (ng/μl)	Microrganismo	Concentração do produto de PCR (ng/μl)
PP 24	512,3	Bactéria	7,5
PP 38	238,7	Bactéria	22,0
TCLB 25	270,1	Bactéria	18,8
TCLB 85	1241,7	Bactéria	22,6
TCMK 73	382,0	Bactéria	10,9
TCMK 105	271,3	Bactéria	14,2
TCMK 109	310,6	Bactéria	25,0
TCMK 112	323,1	Bactéria	29,8
BCLB 11	168,2	Bactéria	22,7
BCLB 24	284,3	Bactéria	18,8
BCLB 85	247,4	Bactéria	25,9
BCLB 122	1736,3	Bactéria	28,0
BCLB 138	224,2	Bactéria	15,5
BCLB 143	721,2	Bactéria	8,1
BCLB 151 A	911,9	Bactéria	11,1
BCLB 151 B	717,5	Bactéria	12,9
BCLB 160 A	409,2	Bactéria	14,5
BCLB 160 B	650,2	Bactéria	21,0
BCLB 179	143,3	Bactéria	21,3
BCLB 197 A	96,7	Bactéria	22,5
BCLB 197 B	776,2	Bactéria	8,3
BCLB 225	49,3	Bactéria	28,5
BCLB 179	143,3	Bactéria	21,3
BCLB 197 A	96,7	Bactéria	22,5
BCLB 197 B	776,2	Bactéria	8,3
BCLB 225	49,3	Bactéria	28,5

Tabela 11. Análise de extração de DNA (Continuação).

Isolados	Concentração de DNA (ng/μl)	Microrganismo	Concentração do produto de PCR (ng/μl)
BCLB 270	897,7	Bactéria	7,2
BCLB 285	673,7	Bactéria	9,1
BCLB 310	530,1	Bactéria	25,9
BCLB 319	896,3	Bactéria	11,2
BCLB 413	399,0	Bactéria	9,5
BCLB 521 A	71,3	Bactéria	22,3
BCLB 521 B	158,2	Bactéria	32,0
BCLB 533	1851,8	Bactéria	12,0
BCLB 547	540,7	Bactéria	10,7
BCLB 553	443,4	Bactéria	9,4
BCLB 580	58,4	Bactéria	21,7
BCLB 580 B	206,0	Bactéria	54,7
BCLB 617 A	409,7	Bactéria	9,3
BCLB 617 B	157,5	Levedura	18,6
BCLB 619	424,2	Bactéria	10,8
BCLB 636	121,2	Bactéria	28,7
BCLB 640	100,5	Bactéria	75,2
BCLB 714	330,3	Bactéria	10,1

Após análise das sequências parciais obtidas, as mesmas foram comparadas com o banco de dados do NCBI através da ferramenta BLASTn. A identificação das linhagens isoladas por gênero ou espécie foi baseada no percentual de similaridade e alinhamento das sequências parciais obtidas comparadas àquelas disponíveis no banco de dados do NCBI.

As Tabelas 12, 13 e 14 apresentam a identificação e similaridade das linhagens dos frutos pupunha, tucumã e bacupari.

Tabela 12. Identificação e similaridade das linhagens isoladas dos frutos pupunha, tucumã e bacupari.

Isolados	Grupo taxonômico / Similaridade (%)	Identificação
PP 24	<i>Enterobacter hormaechei</i> (99,74%), <i>Enterobacter cloacae</i> (99,74%), <i>Enterobacter asburiae</i> (99,48%)	<i>Enterobacter</i> sp.
PP 38	<i>Pantoea dispersa</i> (99,71%)	<i>Pantoea dispersa</i>
TCLB 25	<i>Cronobacter Sakazakii</i> (99,76%), <i>trabulsiella guamensis</i> (99,24%), <i>Cronobacter malonaticus</i> (99,02%)	<i>Cronobacter sakazakii</i>
TCLB 85	<i>Stenotrophomonas Pavanii</i> (99,74%), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99,23%)	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>
TCMK 73	<i>Citrobacter farmeri</i> (99,43%)	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
TCMK 105	<i>Kosakonia arachidis</i> (100%), <i>Kosakonia radicincitans</i> (99,53%) <i>Kosakonia oryzae</i> (99,29%)	<i>Kosakonia arachidis</i>
TCMK 109	<i>Kosakonia radicincitans</i> (99,44%), <i>Kosakonia arachidis</i> (99,44%), <i>Kosakonia oryzae</i> (99,15%)	<i>Kosakonia</i> sp.
TCMK 112	<i>Kosakonia radicincitans</i> (99,45%), <i>Kosakonia arachidis</i> (99,45%) <i>Kosakonia oryzae</i> (99,18%)	<i>Kosakonia</i> sp.
BCLB 11	<i>Pantoea dispersa</i> (99,44%)	<i>Pantoea dispersa</i>
BCLB 24	<i>Pantoea dispersa</i> (99,85%), <i>Pantoea wallisii</i> (99,23%)	<i>Pantoea dispersa</i>
BCLB 85	<i>Pantoea dispersa</i> (99,85%), <i>Pantoea wallisii</i> (99,24%)	<i>Pantoea dispersa</i>
BCLB 122	<i>Proteus columbae</i> (99,57%), <i>Proteus terrae</i> (99,43%), <i>Proteus alimentorum</i> (99,43%)	<i>Proteus</i> sp.
BCLB 138	<i>Pantoea</i> sp.	<i>Pantoea</i> sp.
BCLB 143	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
BCLB 151 A	<i>Klebsiella oxytoca</i> (99,79%)	<i>Klebsiella</i> sp.
BCLB 151 B	<i>Klebsiella oxytoca</i> (99,82%)	<i>Klebsiella oxytoca</i>
BCLB 160 A	<i>Myroides marinus</i> (98,92%)	<i>Myroides marinus</i>
BCLB 160 B	<i>Klebsiella aerogenes</i> (100%), <i>Raoultella terrigena</i> (99,32%)	<i>Klebsiella aerogenes</i>
BCLB 179	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>
BCLB 197 A	<i>Bacillus Amyloliquefaciens</i> (99,84%), <i>Bacillus atrophaeus</i> (99,67%)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

Tabela 13. Identificação e similaridade das linhagens isoladas dos frutos pupunha, tucumã e bacupari (Continuação)

Isolados	Grupo taxonômico / Similaridade (%)	Identificação
BCLB 197 B	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>
BCLB 225	<i>Bacillus siamensis</i> (99,78%), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (99,78%), <i>Bacillus velezensis</i> (99,57%), <i>Bacillus subtilis subsp. Subtilis</i> (99,35%)	<i>Bacillus velezensis</i>
BCLB 270	<i>Klebsiella oxytoca</i> (100%)	<i>Klebsiella oxytoca</i>
BCLB 285	<i>Klebsiella oxytoca</i> (99,81%)	<i>Klebsiella</i>
BCLB 285	<i>Klebsiella oxytoca</i> (99,81%)	<i>Klebsiella</i>
BCLB 310	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
BCLB 319	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>
BCLB 413	<i>Pantoea dispersa</i> (99,54%), <i>Pantoea wallisii</i> (99,07%)	<i>Pantoea</i> sp.
BCLB 521 A	<i>Bacillus velezensis</i> (100%), <i>Bacillus siamensis</i> (99,79%), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (99,79%)	<i>Bacillus velezensis</i>
BCLB 521 B	<i>Bacillus velezensis</i> (100%), <i>Bacillus siamensis</i> (99,79%), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (99,79%)	<i>Bacillus velezensis</i>
BCLB 533	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (100%)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BCLB 547	<i>Raoultella planticola</i> (100%), <i>Klebsiella aerogenes</i> (100%), <i>Raoultella ornithinolytica</i> (100%), <i>Cronobacter muytjensii</i> (99,65%)	<i>Raoultella planticola</i>
BCLB 553	<i>Raoultella planticola</i> (100%), <i>Klebsiella aerogenes</i> (100%), <i>Raoultella ornithinolytica</i> (100%)	<i>Raoultella planticola</i>

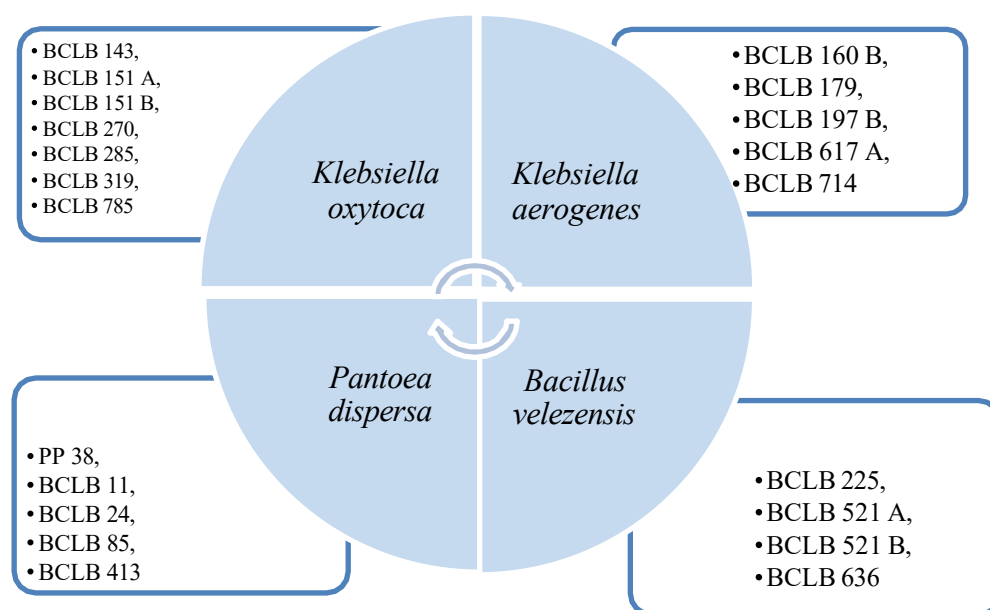
Tabela 14. Identificação e similaridade das linhagens isoladas dos frutos pupunha, tucumã e bacupari (Continuação)

Isolados	Grupo taxonômico / Similaridade (%)	Identificação
BCLB 580 A	<i>Bacillus subtilis</i> (100%), <i>Bacillus siamensis</i> (99,72%), <i>Bacillus velezensis</i> (99,72%), <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (99, 72%)	<i>Bacillus subtilis</i>
BCLB 580 B	<i>Enterobacter hormaechei</i> (99,56%), <i>Enterobacter cloacae</i> (99,32%), <i>Pantoea agglomerans</i> (99,32%), <i>Enterobacter cloacae subsp. dissolvens</i> (99,32%)	<i>Enterobacter</i> sp.
BCLB 617 A	<i>Klebsiella aerogenes</i> (100%), <i>Raoultella ornithinolytica</i> (100%), <i>Raoultella planticola</i> (100%), <i>Raoultella terrigena</i> (99.68%)	<i>Klebsiella aerogenes</i>
BCLB 617 B	<i>Candida</i> sp.	<i>Candida</i> sp
BCLB 640	<i>Bacillus siamensis</i> (100 %), <i>Bacillus velezensis</i> (100 %), <i>Bacillus subtilis subsp. Subtilis</i> (99.70%)	<i>Bacillus siamensis</i>
BCLB 714	<i>Klebsiella aerogenes</i> (99.78%), <i>Raoultella ornithinolytica</i> (99.56%), <i>Raoultella planticola</i> (99.56%)	<i>Klebsiella aerogenes</i>
BCLB 785	<i>Klebsiella oxytoca</i> (99.78%)	<i>Klebsiella oxytoca</i>
BCLB 800	<i>Micrococcus aloeverae</i> (100%), <i>Micrococcus luteus</i> (99.76%), <i>Micrococcus yunnanensis</i> (99.76%)	<i>Micrococcus aloeverae</i>
BCLB 802	<i>Micrococcus aloeverae</i> (100 %), <i>Micrococcus luteus</i> (99.76%), <i>Micrococcus yunnanensis</i> (99.76%)	<i>Micrococcus aloeverae</i>
BCLB 822	<i>Bacillus cereus</i> (100%), <i>Bacillus tropicus</i> (100%), <i>Bacillus paramycoides</i> (100%), <i>Bacillus</i> <i>nitratireducens</i> (100%), <i>Bacillus luti</i> (100%), <i>Bacillus albus</i> (100%)	<i>Bacillus</i> sp.
BCMK 549	<i>Klebsiella grimontii</i> (100%), <i>Enterobacter bugandensis</i> (100%), <i>Kosakonia cowanii</i> (100%), <i>Kosakonia pseudosacchari</i> (100%), <i>Klebsiella oxytoca</i> (100%)	<i>Klebsiella</i> sp.

Entre os 45 isolados, 7 isolados apresentaram máxima similaridade com a espécie *Klebsiella oxytoca*, 5 isolados com *Klebsiella aerogenes*, 2 para espécies do gênero *Klebsiella*, 5 isolados apresentaram maior similaridade com *Pantoea dispersa*, 1 com espécie do gênero *Pantoea*, 4 isolados com *Bacillus velezensis*, 2 com espécies do gênero *Bacillus*, 1 identificada como *Bacillus amyloliquefaciens*, 2 isolados pertencentes ao gênero *Kosakonia*, 2 isolados identificados como *Kosakonia arachidis*, além de 2 isolados do gênero *Enterobacter* sp; ainda foram identificados 2 representantes do filo Actinobacteria da espécie *Micrococcus aloeverae*, 1 linhagem identificada como *Raoultella planticola*, 1 isolado de *Cronobacter sakazakii*, 1 linhagem com máxima similaridade para *Stenotrophomonas pavanii*, 1 para *Citrobacter amalonaticus*, 1 isolado identificado entre espécies do gênero *Proteus*, 1 linhagem com alta similaridade com espécies do gênero *Myroides*, 1 isolado identificado como *Acinetobacter radioresistens*, além de 1 linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*.

A identificação molecular apresentou uma diversidade de espécies, sendo a maioria de *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes*, *Pantoea dispersa* e *Bacillus velezensis*. A figura 12 apresenta os isolados que apresentaram similaridade de espécies.

Figura 12. Isolados do fruto bacupari, tucumã e pupunha que apresentaram similaridade de espécies.



Apesar da similaridade dos isolados com o gênero *Klebsiella*, estudos relatando a produção de pectinase por este gênero são escassos, entretanto, Abdel-Aziz et al. (2018), isolou uma pectinase com alta especificidade (91,4U/ml) e com base na análise molecular 16s rRNA o isolado apresentou 99% de similaridade com *Klebsiella oxytoca*. Latif e Sohail (2012), isolaram bactérias para a produção de poligalacturonase e as sequências de rRNA das colônias que apresentaram maiores zonas de hidrólise foram identificadas como *Klebsiella pneumonia* e *Klebsiella variicola*.

A maioria dos isolados identificados como *Bacillus velezensis* apresentaram similaridade com outras espécies do gênero, entre eles *Bacillus siamensis* (BCLB 225,521 A, BCLB 521 B, BCLB 636), *Bacillus amyloliquefaciens* (BCLB 225, 521 A, BCLB 521 B, BCLB 636), *Bacillus subtilis* (BCLB 225, BCLB 521 A, BCLB 521 B, BCLB 636), *Bacillus nematocida* (BCLB 225, BCLB 521 A, BCLB 521 B, BCLB 636), *Bacillus atrophaeus* (BCLB 225, BCLB 521 A, BCLB521 B, BCLB 636) e *Bacillus vallismortis* (BCLB521 B e BCLB 636).

Dentre os gêneros relatados na literatura para a produção de pectinases, o *Bacillus* é um dos mais importantes industrialmente, sendo considerado um grande produtor da enzima (OUMER; ABATE, 2018; ROY et al., 2018; ABDOLLAHZADEH et al., 2020; RAJU; DIVACAR, 2013) .

Oumer e Abate (2018), em sua triagem de microrganismos pectinolíticos da polpa de café, isolaram um total de 95 microrganismos, sendo 65,26% dos isolados bactérias. Com base nas identificações moleculares utilizando o gene 16S rRNA, a maioria dos isolados foram confirmados como *Bacillus*.

Sohail e Latif (2016), ao isolarem 14 cepas de *Bacillus* e oito cepas de *Pseudomonas*, para a produção de poligalacturonase a partir de resíduos de frutas e vegetais, obtiveram entre os *Bacillus*, o *Bacillus vallismortis* isolado da manga o maior produtor da enzima, produzindo até 4,4 U/ μ L.

O que torna o *Bacillus* predominante comercialmente entre os gêneros bacterianos, é que a maioria é ambientalmente segura, não possuem muitas exigências nutricionais, são fáceis de manipular, e informações genéticas sobre genes de muitos *Bacillus* sp. estão disponíveis em vários bancos de dados de sequências de nucleotídeos, portanto suporta clonagem e expressão bem sucedidas do gene da pectinase em outros organismos (KAVUTHODI; SEBASTIAN, 2018; SOHAIL; LATIF, 2016).

A única levedura obtida no presente trabalho, pertence ao gênero *Candida* sp. (BCLB 617 B), algumas leveduras produzem um ou dois tipos de pectinases, porém a produção desta enzima não é tão difundida nelas. Entre os gêneros mais relatados na

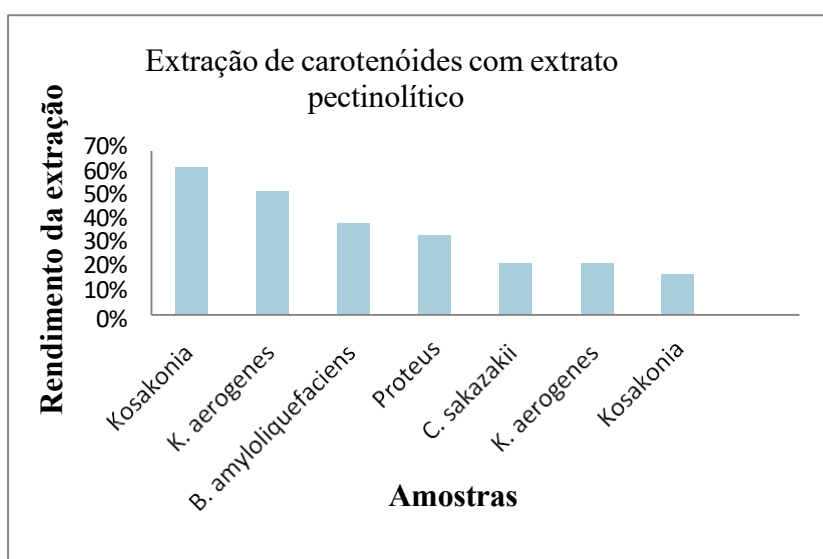
literatura estão *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Cryptococcus* e *Candida* (AMIN; BHATTI; BILAL, 2019). Afolabi e Shitta (2020) isolaram leveduras de diferentes alimentos fermentados e entre os isolados com maior capacidade de produção da pectinase, destacaram-se *Candida* sp. e *Candida tropicalis*.

5.7 Análise de Carotenóides

Os 45 microrganismos que apresentaram produção de pectinase foram testados quanto à sua capacidade de extração de carotenóides em tomate. Sete extratos enzimáticos produzidos pelas linhagens *Kosakonia* sp (TCMK109), *Klebsiella aerogenes* (BCLB197), *Bacillus amyloliquefaciens* (BCLB197A), *Proteus* sp. (BCLB122), *K. aerogenes* (BCLB179), *Cronobacter sakazakii* (TCLB25) e *Kosakonia* sp. (TCMK 112) apresentaram potencial para a extração de carotenóides (Figura 8).

O maior rendimento foi observado pela linhagem *Kosakonia* sp. (TCMK 109) com ganho de 63% em relação à amostra controle, seguida por *K. aerogenes* (BCLB 197 B) com um ganho de 53% a mais que a amostra controle. A linhagem *B. amyloliquefaciens* (BCLB 197 A) com um ganho de 39%, linhagem *Proteus* sp. (BCLB 122) com 34%, linhagens *C. sakazakii* (TCLB 25) e *K. aerogenes* (BCLB 179) com 22% e linhagem *Kosakonia* sp. (TCMK 112) com 17%. A enzima pectinase geralmente é empregada na etapa de pré-tratamento antes da extração com solvente, ela atua na quebra das substâncias pécicas (STRATI et al., 2015).

Figura 13. Extração de carotenóides com extrato enzimático de linhagens bacterianas isoladas de frutos bacupari e tucumã.



Os frutos de tomates são uma das principais fontes de antioxidantes, incluindo carotenóides, principalmente α -caroteno, β -caroteno, luteína e licopeno. O licopeno é o carotenoide mais presente, constituindo mais de 85% dos carotenóides totais, é o responsável pela coloração vermelha dos tomates maduros (CATALKAYA; KAHVECI, 2019; CANENE ADAMS et al., 2005; GIOVANUCCI et al., 2002).

O presente trabalho demonstrou que os 7 extratos brutos enzimáticos produzidos pelos microrganismos apresentaram resultados positivos para aplicação na extração de carotenóides em tomates. O experimento foi realizado na temperatura de 30 °C, esta temperatura está entre a faixa de temperaturas empregadas nas extrações de pigmentos, geralmente realizada de 30 a 45 °C. A extração de pigmentos diminui em temperaturas acima de 45 °C devido à degradação do pigmento. Para uma extração mais eficiente é necessário conhecer a temperatura ideal e pH ótimo de ação enzimática, isso influencia no rendimento de carotenóides. Altas temperaturas afetam o rendimento devido à desnaturação enzimática. Alguns trabalhos relatam que a extração de pigmentos aumenta até a temperatura de 40 °C (SHARMA; DHIMAN; ATTRI, 2020; SHARMA; SOGI, 2022, SAHU et al., 2016; NORSHAZILA et al., 2017).

Na literatura diversos trabalhos relatam que o uso da enzima pectinase aumenta o rendimento de carotenóides. A maioria das extrações enzimáticas geralmente envolvem um coquetel enzimático ou emprego de extração enzimática associada a outras técnicas de extração, como alta pressão. (NATH et al., 2016; GHOSH; BISMAS, 2016; STRATI et al., 2015; CATALKAYA; KAHVECI, 2019; GENGATHARAN et al, 2021; AMIRI-RIGI et al., 2016, JALALI-JIVAN et al., 2021; MARATHE et al., 2019).

Strati et al. (2015), em seu estudo de extração de carotenóides de resíduos de tomate por extração assistida por enzimas e alta pressão, alcançaram um aumento de 6 a 10 vezes, respectivamente, em relação às amostras não tratadas com enzimas. O aumento de rendimento foi obtido com o uso de lactato de etila como solvente, e o teor de rendimento máximo de carotenóides totais foram de 127 mg/ g e de licopeno 89,4 mg/kg.

5.8 Propriedades Bioquímicas das Pectinases Produzidas

5.8.1 Determinação das melhores condições de temperatura e sua influência na atividade enzimática

A temperatura é um parâmetro importante para a atividade de uma enzima. As condições de temperatura da enzima foram avaliadas na faixa de 20 a 60 °C, e até 65 °C para a linhagem *Kosakonia* sp TCMK 112, com intervalos de 5 °C (Figura 14). A linhagem *Proteus* sp. BCLB 122 apresentou maior atividade na temperatura de 35°C (0,93 U/mL), as linhagens *B. amyloliquefaciens* BCLB 197 A e *Kosakonia* sp. TCMK 109 alcançaram atividade máxima na temperatura de 40 °C (0,83 U/mL e 0,64 U/mL, respectivamente). *K. aerogenes* BCLB 179 e *C. sakazakii* TCLB 25 na temperatura de 45 °C (0,82 U/mL e 1,07 U/mL, respectivamente), enquanto *K. aerogenes* BCLB 197 B e *Kosakonia* sp. TCMK 112 na temperatura de 50 °C (0,99 U/mL e 0,97 U/mL, respectivamente).

Os resultados observados neste trabalho sugerem que a pectinase possui atividade ótima entre as temperatura de 35 °C a 50 °C (100%), permanecendo com atividade acima de 70% entre as temperaturas de 45 °C e 55 °C. Esses resultados são importantes para o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos contendo enzimas produzidas por diferentes linhagens microbianas. O aumento da temperatura resultou na redução da atividade enzimática devido à modificação na estrutura tridimensional da enzima, que prejudica sua interação com o substrato (ÁZAR et al., 2020; AMIN et al., 2013).

Figura 14. Valores de temperatura ótima para atividade pectinolítica de linhagens bacterianas. Legenda: A= *C. sakazakii* (TCLB 25), B= *B. Amyloliquefaciens* (BCLB 197 A).

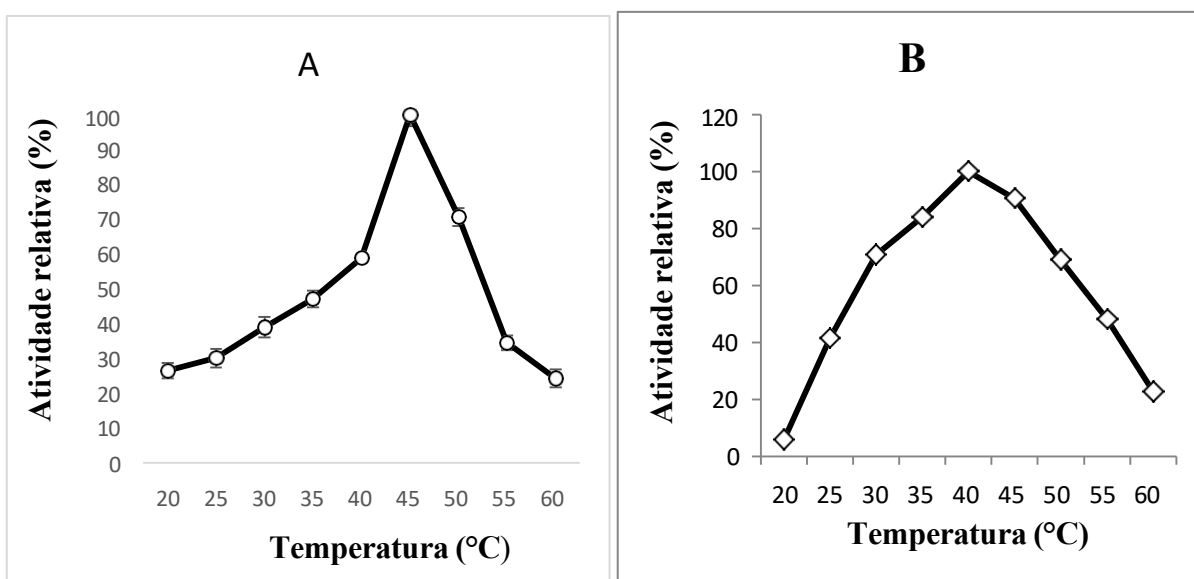


Figura 15. Valores de temperatura ótima para atividade pectinolítica de linhagens bacterianas. Legenda: C= *K. aerogenes* (BCLB 197 B), D= *Proteus* sp. (BCLB 122), E= *Kosakonia* sp. (TCMK 112), F= *Kosakonia* sp. (TCMK 109).

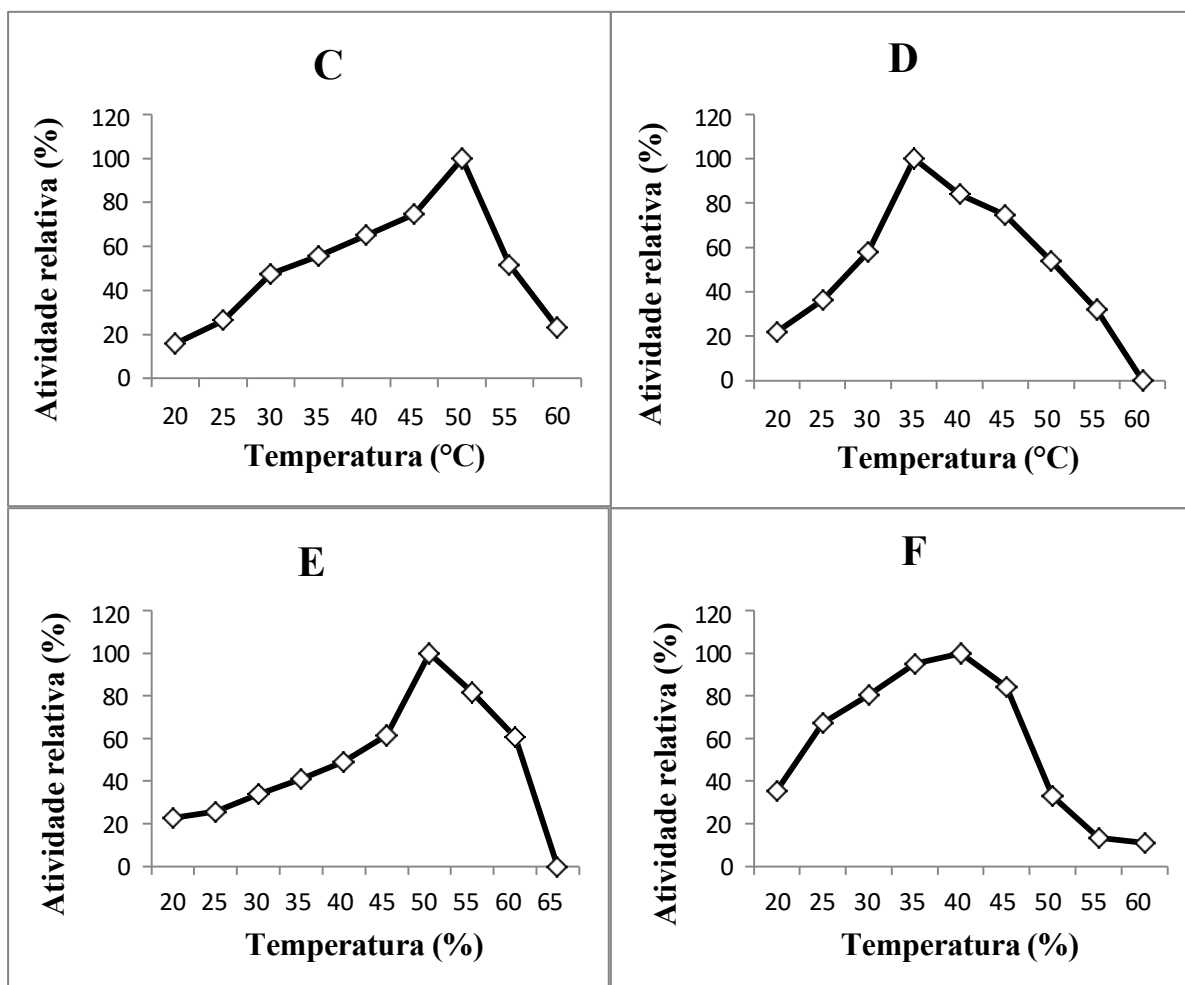
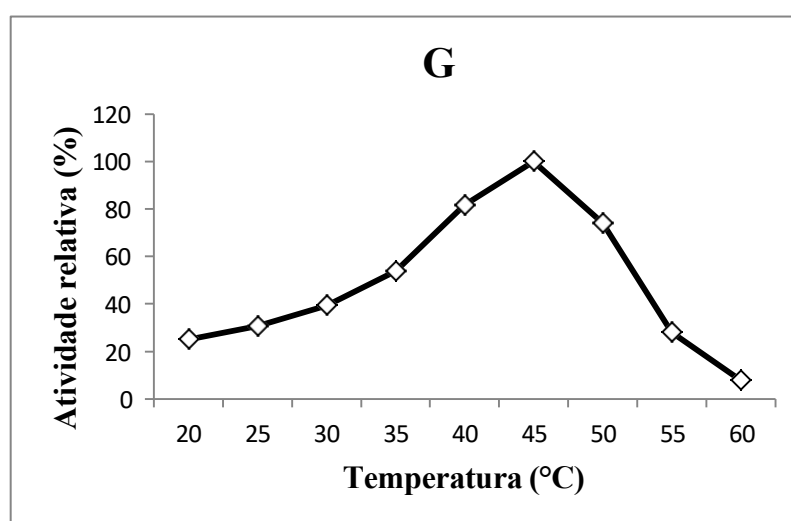


Figura 16. Valores de temperatura ótima para atividade pectinolítica de linhagens bacterianas. Legenda: G= *K. aerogenes* (BCLB 179).



A temperatura ótima de cada enzima é um fator que influencia diretamente na reação enzimática. Variações fora das condições ótimas resultam no aumento da agitação das moléculas aumentando a frequência das colisões entre o substrato e a enzima causando a desnaturação enzimática. Esta desnaturação modifica a estrutura da enzima e, portanto a enzima passa a ser desprovida de atividade (SCRIBAN, 1985).

A maioria dos microrganismos produtores de pectinases utilizados nas indústrias é de natureza mesofílica (20 °C a 50 °C). Em processos industriais as temperaturas encontradas no presente trabalho são adequadas para aplicação na clarificação de sucos de frutas, que geralmente é realizada entre 30 °C a 50 °C (JOHN et al., 2020; UZUNER; CEKMECELIOGLU, 2021; UZUNER; CEKMECELIOGLU, 2015; KUMAR et al., 2012).

Murugan et al. (2021), ao caracterizarem uma pectinase extracelular de uma espécie de *Bacillus* spp. isolada de solo de resíduos de frutas, alcançaram boa atividade em temperatura de 40 °C, temperatura semelhante a encontrado no presente trabalho pela linhagem *Bacillus amyloliquefaciens* BCLB 197 A (40°C). Yu e Xu (2018) caracterizaram uma pectinase ácida tolerante ao calor de *Bacillus* sp. e obtiveram temperatura ótima para a enzima de 37 °C.

Torimiro et al. (2018) em seu estudo para determinar as atividades pectinolíticas de pectinase produzida por alguns isolados bacterianos, alcançaram a melhor atividade para *K. aerogenes* na temperatura de 50 °C, temperatura semelhante a linhagem *K. aerogenes* (BCLB 197 B) relatada no presente trabalho.

5.8.2 Determinação das melhores condições de pH e sua influência na atividade enzimática

O pH é um fator físico-químico importante na atividade enzimática, pois afeta diretamente sua produtividade. Na determinação dos valores ótimos de pH, o pH variou de 1 a 8 para as linhagens *K. aerogenes* (BCLB 179) e *Kosakonia* sp. (TCMK 109), e de 2 a 8 para *Proteus* sp. (BCLB 122), *B. amyloliquefaciens* (BCLB 197 A), *K. aerogenes* (BCLB 197 B) *C. sakazakii* (TCLB 25) e *Kosakonia* sp. (TCMK 112). Os valores do pH ótimo de cada microrganismo estão apresentados nas Figuras 17 e 18.

As enzimas das linhagens avaliadas apresentaram maiores atividades em uma faixa de pH ácido. A linhagem *Kosakonia* sp. (TCMK 109) apresentou atividade ótima em pH 3,0

(1,54 U/mL); enquanto que as linhagens *K. aerogenes* (BCLB 179), *K. aerogenes* (BCLB 197 B) e *Kosakonia* sp. (TCMK 112) apresentaram atividade ótima em pH 3,5 (1,13 U/mL, 1,24 U/mL, 1,30 U/mL, respectivamente). *Proteus* sp. (BCLB 122) e *C. sakazakii* (TCLB 25) em pH 4,0 (1,28 U/mL, 1,12 U/mL, respectivamente), enquanto a linhagem *Bacillus amyloliquefaciens* (BCLB 197 A) apresentou maior atividade em pH 5,5 (0,93 U/mL).

Figura 17. Valores de pH ótimo para atividade pectinolítica de linhagens bacterianas. Legenda: A= *C. sakazakii* (TCLB 25), B= *B. Amyloliquefaciens* (BCLB 197 A), C= *K. aerogenes* (BCLB 197 B), D= *Proteus* sp. (BCLB 122).

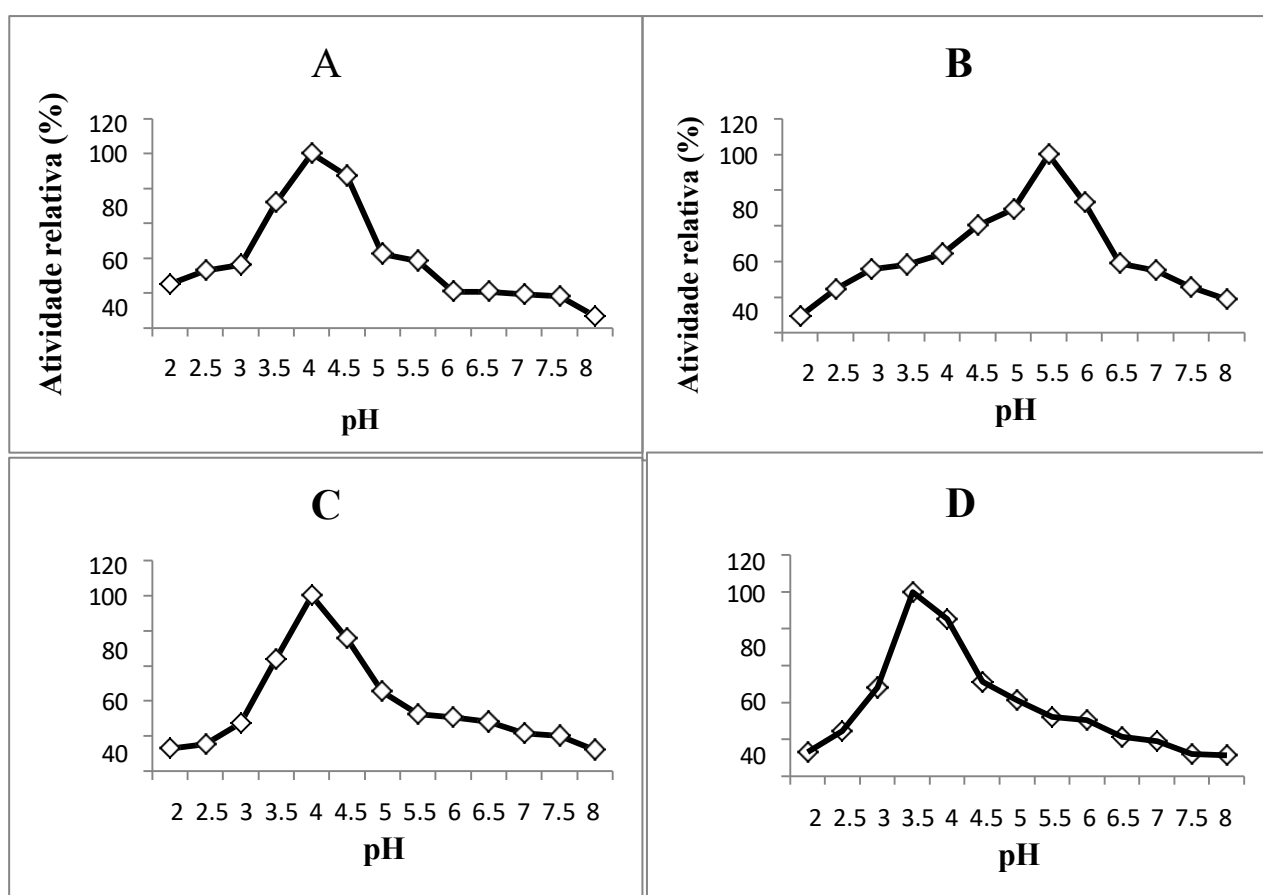
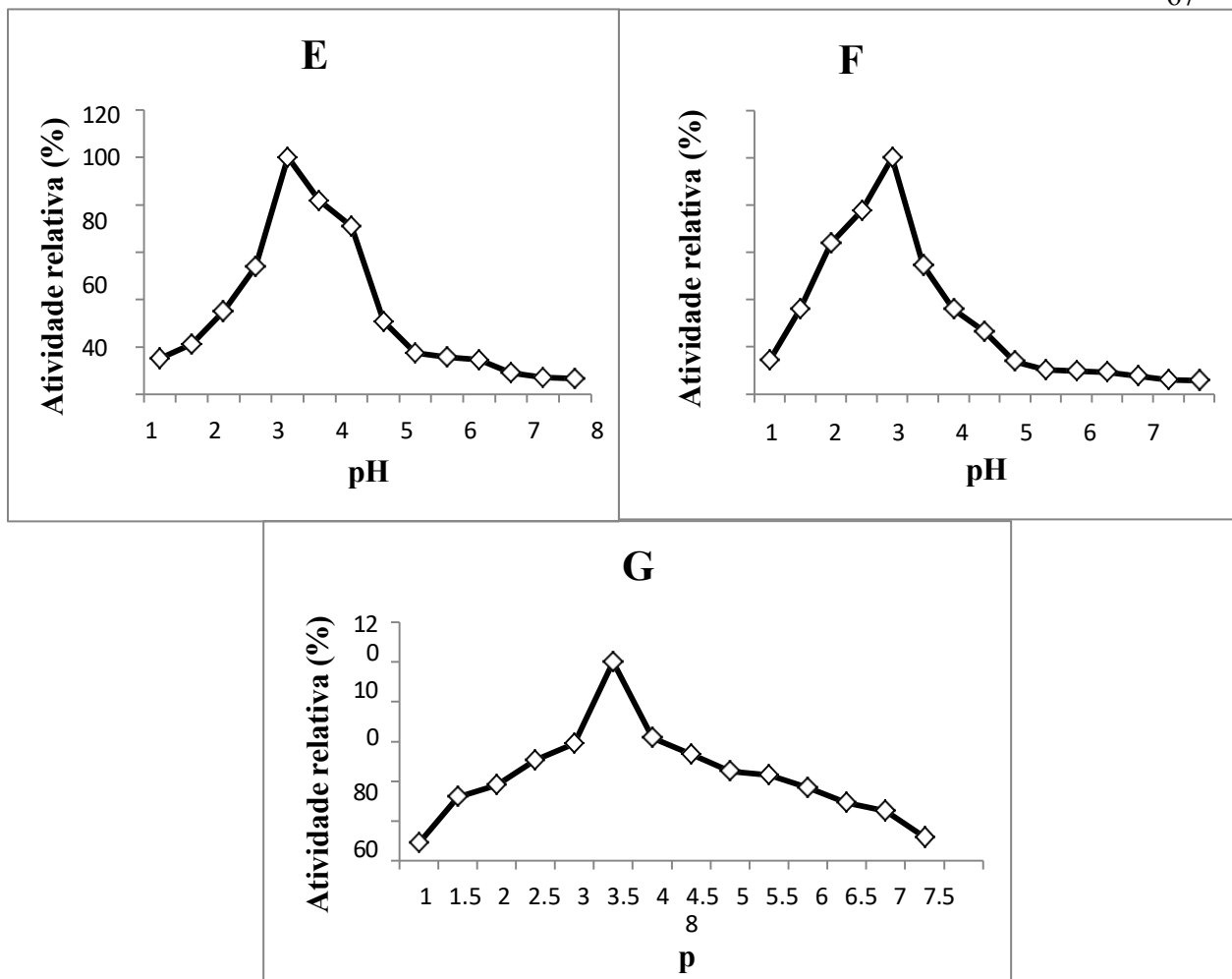


Figura 18. Valores de pH ótimo para atividade pectinolítica de linhagens bacterianas. E= linhagem *Kosakonia* sp. (TCMK 112), F= linhagem *Kosakonia* sp. (TCMK 109), G= *K. aerogenes* (BCLB 179).



Conforme mostrado nas figuras 17 e 18, um aumento no pH acima da atividade ótima exerceu um efeito negativo na atividade da enzima. A atividade das enzimas depende diretamente da sua estrutura tridimensional. Portanto, qualquer tratamento que modifique a sua estrutura (temperatura, pH, etc), dificulta ou impede a fixação do substrato na enzima ou ainda modifica a estrutura do seu sítio ativo alterando as propriedades catalíticas da enzima e, portanto, o seu funcionamento (SCRIBAN, 1985).

A maioria das pectinases ácidas relatadas na literatura é obtida de fungos, muito utilizados na indústria devido sua estabilidade ao pH e a temperatura. Entretanto, no presente trabalho as 7 linhagens analisadas quanto ao pH são espécies bacterianas, podendo estar relacionado ao pH dos frutos explorados no trabalho (SILVA et al., 2013; YUYAMA et al., 2008).

Recentemente, Zhong et al. (2021) relataram atividade ótima em pH 5,0 obtida da bactéria *Paenibacillus xylanexedens*. Doan et al. (2021), utilizando a cepa *B. amyloliquefaciens* para a produção de pectinases, observaram atividade ótima para a enzima no pH 6, valor próximo ao encontrado no presente trabalho por *B. amyloliquefaciens* 197 A (pH 5,5).

As pectinases ácidas possuem aplicações mais amplas, devido a isso são muito utilizadas na indústria de alimentos, como na extração e clarificação de sucos e indústrias cervejeiras (MARTINS et al., 2002; MOYO et al., 2003; REBELLO et al., 2017; JOHN et al., 2020). Assim, as linhagens obtidas no presente trabalho podem apresentar potencial para aplicação industrial.

6 CONCLUSÕES

- Os frutos amazônicos apresentam potencial para a prospecção de microrganismos capazes de produzir enzimas pectinolíticas. No presente trabalho foram isoladas 1 . 9 38 colônias dos frutos amazônicos bacupari, tucumã e pupunha.
- 45 isolados apresentaram resultados positivos para a pectinase, a maioria são espécies bacterianas de *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes*, *Pantoea dispersa* e *Bacillus velezensis* e uma levedura do gênero *Candida* sp.
- A linhagem *Klebsiella oxytoca* foi considerada a mais promissora para a produção enzimática, apresentando uma atividade pectinolítica de 1,38 U/mL. As características bioquímicas analisadas demonstraram que as enzimas possuem atividade ótima em temperaturas de 35 a 50°C e pH ácido de 3,0 a 5,5.
- A análise de extração de carotenóides em tomates demonstrou que 7 linhagens apresentam potencial para a aplicação, sendo a linhagem *Kosakonia* sp. (TCMK 109) apresentou o maior rendimento, com ganho de 63% em relação à amostra controle.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZIZ, N.; ATALLAH, A.G.; ABDEL-AAL, S.K.; MOHAMED, E.A.; IBRAHIM, S.A.; ZEIN ELABEDEEN, A. Isolation, identification and molecular characterization of the pectinase producer bacterial isolate *Klebsiella oxytoca*. **Journal of Agricultural Sciences of the Arab Universities**, v. 27, n. 1, p. 553-561, 2019.

ABDOLLAHZADEH, R.; PAZHANG, M.; NAJAVAND, S.; FALLAHZADEH-MAMAGHANI, V.; AMANI-GHADIM, A.R. Tscreening of pectinase-producing bacteria from agricultural land and optimization of enzyme production from RSM-selected strains. **Microbiological Folia**. v. 65, n. 4, p. 705-719, 2020.

ACOSTA-ESTRADA, B.A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J.A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.BOUND. Phenolics in foods, a review. **Food chemistry**. v. 152, p. 46-55, 2014.

ADELEKE, B.S.; BABALOLA, O.O. Roles of plant endosphere microbes in agriculture - a review. **Journal of Plant Growth Regulation**. p. 1-18, 2021.

ADRIO, J.; DEMAİN, A. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**. v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.

AFOLABI, F.T.; SHITTA, Y.O. Screening of yeasts obtained from different fermented foods for their ability to produce pectinase. **European Journal of Biological Research**. v. 10, no. 2, p. 118-131, 2020.

AGGARWAL, R.; DUTTA, T.; SHEIKH, J. Extraction of *Candida* pectinase isolated from textile industry effluent and its application in cotton bio-peeling. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**. v. 17, p. 100291, 2020.

AIRES, A.; DIAS, C.; CARVALHO, R.; SAAVEDRA, M.J. Analysis of glycosylated flavonoids extracted from acerola stems as antibacterial agents against pathogenic *Escherichia coli* isolates. **Acta Biochimica Polonica**. v. 64, n. 2, p. 265-271, 2017.

AJILA, C.M.; BRAR, S.K.; VERMA, M.; TYAGI, R.D.; GODBOUT, S.; VALÉRO, J.R. Bioprocessing of agro-by-products for animal feed. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 32, n. 4, p. 382-400, 2012.

ALIMARDANI-THEUIL, P.; GAINVORS-CLAISSE, A.; DUCHIRON, F. Yeasts: An attractive source of pectinases – From gene expression to potential applications: A review. **Process Biochemistry**. vol. 46, n. 8, p. 1525-1537, 2011.

ALKORTA, I.; GARBISU, C.; LLAMA, M. J.; SERRA, J. L. Industrial applications of pectic enzymes : a review. **Process Biochemistry**. v. 33, p. 21–28, 1998.

AL-NAJADA, A. R.; AL-HINDI, R. R.; MOHAMED, S. A. Characterization of polygalacturonases from fruit spoilage *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus tubingensis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 34, p. 8527-8536, 2012.

AMANN, R.I; LUDWIG, W. SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without culture. **Microbiological Reviews**. v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

AMIN, F.; BHATTI, H.N.; BHATTI, I.A.; ASGHER, M. Use of wheat bran for increased production of exopoligalacturonase by *penicillium notatum* by surface response methodology. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**. v. 50, n. 3, 2013.

AMIN, F.; BHATTI, H.N.; BILAL, M. Recent advances in microbial pectinase production strategies— A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.122, p. 1017-1026, 2019.

AMIN, F.; MOHSIN, A.; BHATTI, H. N.; BILAL, M. Production, thermodynamic characterization, and fruit juice quality improvement characteristics of an Exo-polygalacturonase from *Penicillium janczewskii*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**. v. 1868, n. 5, p. 140379, 2020.

AMIRI-RIGI, A.; ABBASI, S.; SCANLON, M.G. Improved extraction of lycopene from industrial tomato residues by the microemulsion technique: optimization of enzymatic and ultrasonographic pre-treatments. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 35, p. 160-167, 2016.

ANAND, G.; YADAV, S.; YADAV, D. Production, purification and biochemical characterization of an exopolygalacturonase from *Aspergillus niger* MTCC 478 suitable for orange juice clarification. 3 **Biotech**. v. 7, n. 2, p. 1-8, 2017.

ANISA, S. K.; GIRISH, K. Pectinolytic activity of *Rhizopus* sp. and *Trichoderma viride*. **International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology**. v. 4, n. 2, p. 28-31, 2014.

ARAMBEL, M. J.; WIEDMEIER, R. D.; WALTERS, J. L. Influence of donor animal adaptation to added yeast culture and/or *Aspergillus oryzae* fermentation extract on in vitro rumen fermentation. **Nutrition reports international**, v. 35, n. 3, p. 433-437, 1987.

ARAÚJO, F.O. Effect of bacupari bark extract (*Garcinia brasiliensis*) on hepatic steatosis, oxidative stress, inflammation and intestinal microbiota in obese Wistar rats. 2017.

AREKEMASE, O. M.; OMOTOSHO, I. O.; AGBABIAKA, T. O.; AJIDE-BAMIGBOYE, N. T.; LAWAL, A. K.; AHMED, T.; OROGU, J. O. Optimization of bacteria pectinolytic enzyme production using banana peel as substrate under submerged fermentation. **Science World Journal**, v. 15, n. 1, p. 56-63, 2020.

ARWA, P. S.; ZERAIK, M. L.; XIMENES, V. F.; DA FONSECA, L. M.; DA SILVA BOLZANI, V.; SILVA, D. H. S. Redox-active biflavonoids from *Garcinia brasiliensis* as inhibitors of neutrophil oxidative burst and human erythrocyte membrane damage. **Journal of ethnopharmacology**, v. 174, p. 410-418, 2015.

ASSADPOUR, E.; MAHDI JAFARI, S. A systematic review on nanoencapsulation of bioactive food and nutraceutical ingredients by various nanocarriers. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 59, no. 19, p. 3129-3151, 2019.

ATHIRA, R. S., KURUVILLA MATHEW, A.; PANDEY, A. Production of pectinase from *Bacillus sonorensis* MPTD1. **Food technology and biotechnology**. v. 56, n. 1, p. 110-116, 2018.

AVILA-SOSA, R.; MONTERO-RODRÍGUEZ, A.F.; AGUILAR-ALONSO, P.; VERA-LÓPEZ, O.; LAZCANO-HERNÁNDEZ, M.; MORALES-MEDINA, J.C.; NAVARRO-CRUZ, A.R. Antioxidant properties of Amazonian fruits: a mini review of in vivo and in vitro studies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.

ÁZAR, R.I.L.; DA LUZ MORALES, M., MAITAN-ALFENAS, G.P.; FALKOSKI, D.L.; ALFENAS, R.F.; GUIMARÃES, V.M. Clarification of apple juice by a purified polygalacturonase from *Calonectria pteridis*. **Food and Bioproducts Processing**. v. 119, p. 238-245, 2020.

AZEVEDO, J. S. M.; CORREIA, A.; HENRIQUES, I.; Molecular analysis of the diversity of genus *Psychrobacter* present within a temperature estuary. **FEMS Microbiology Ecology**, V. 84, P. 451–460, 2013.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I.S.M.; RAHMAN, M.M.; SHARIF, K.M.; MOHAMED, A., SAHENA, F.; OMAR, A.K.M. Techniques for extracting bioactive compounds from plant materials: A review. **Food engineering journal**. v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013.

BABAGIL, A.; NADAROGLU, H. Purification of the pectin lyase enzyme from the bacterium *Bacillus pumilus* by the three-phase partition method (TPP), nanoflower preparation and investigation of fruit juice clarification. **Biointerface Research in Applied Chemistry**. v. 12, p. 3938-55, 2022.

BAGCI, P.O. Effective clarification of pomegranate juice: a comparative study of pretreatment methods and their influence on ultrafiltration flow. **Journal of Food Engineering**. v. 141, p. 58-64, 2014.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agro-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. **Food chemistry**. v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BAMISILE, B.S.; SENYO AKUTSE, K.; DASH, C.K.; QASIM, M.; RAMOS AGUILA, L.C.; ASHRAF, H.J.; WANG, L. Effects of seedling age on colonization patterns of Citrus limon plants by the endophytes *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their influence on seedling growth. **Magazine of Fungi**. v. 6, n. 1, p. 29, 2020.

BARRAGÁN, A. E.; HUERTA-OCHOA, S. Screening of microorganisms for bioconversion of (+) - valencene to (+) - nootkatone. **LWT-Food Science and Technology**. v. 64, n. 2, p. 788-793, 2015.

BARROS, R.G.C.; DE OLIVEIRA, C.S.; OLIVEIRA, L.T.S, PEREIRA, U.C.; SILVA, T.O.M.; DENADAI, M.; NARAIN, N. Increased production of phenolic antioxidants in submerged cultures of endophytic microorganisms isolated from achachairu fruits (*Garcinia humilis*), araçá-boi (*Eugenia stipitata*) and bacaba (*Oenocarpus bacaba*). **LWT**. v. 111, p. 370-377, 2019.

BATISTA, B. D.; LACAVA, P. T.; FERRARI, A.; TEIXEIRA-SILVA, N. S.; BONATELLI, M. L.; TSUI, S.; MONDIN, M.; KITAJIMA, E. W.; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, v. 206, p. 33-42, 2018.

BELDA, I.; CONCHILLO, L.B.; RUIZ, J.; NAVASCUÉS, E.; MARQUINA, D.; SANTOS, A. Selection and use of pectinolytic yeasts to improve clarification and phenolic extraction in winemaking. **International Journal of Food Microbiology**. v. 223, p. 1-8, 2016.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS microbiology ecology**. v. 68, n. 1, p. 1-13, 2009.

BERGMANN, J.C.; TUPINAMBÁ, D.D.; COSTA, O.Y.A.; ALMEIDA, J.R.M.; BARRETO, C.C.; QUIRINO, B.F. Biodiesel production in Brazil and alternative biomass raw materials. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 21, p. 411-420, 2013.

BEZERRA, J.D.P.; SANTOS, M.G.S.; SVEDESE, V.M.; LIMA, D.M.M.; FERNANDES, M.J.S.; PAIVA, L.M.; SOUZA-MOTTA, C.M. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 28, n. 5, p. 1989-1995, 2012.

BHARADWAJ, P.S.; UDUPA, P.M. Isolation, purification and characterization of the pectinase enzyme from *Streptomyces thermocarboxydus*. **Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology**. v. 5, n. 1, p. 001-006, 2019.

BHARDWAJ, V.; DEGRASSI, G.; BHARDWAJ, R. K. Microbial pectinases and their applications in industries: a review. **Polymer**. v. 4, n. 08, 2017.

BISWAS, P.P.; MONDAL, M.; DE, S. Comparison between centrifugation and microfiltration as primary clarification of gourd juice (*Lagenaria siceraria*). **Journal of Food Processing and Preservation**. v. 40, n. 2, p. 226-238, 2016.

BIZ, A.; FARIAS, F.C.; MOTTER, F.A.; DE PAULA, D.H.; RICHARD, P.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A. Determination of pectinase activity: an early deceleration in the release of reducing sugars throws a wrench in the works!. **PLoS One**. v. 9, n. 10, p. 109529, 2014.

CAFFALL, K.H.; MOHNEN, D. The structure, function and biosynthesis of pectic polysaccharides from the plant cell wall. **Carbohydrate Research**. vol. 344, n. 14, p. 1879-1900, 2009.

CANENE-ADAMS, K.; CAMPBELL, J.K.; ZARIPHEH, S.; JEFFERY, E.H.; ERDMAN J.R.; J.W. Tomatoes as a functional food. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 5, p. 1226-1230, 2005.

CANTU-JUNGLES, T.M.; CIPRIANI, T.R.; IACOMINI, M.; HAMAKER, B.R.; CORDEIRO, L.M. A pectic polysaccharide from peach palm fruits (*Bactris gasipaes*) and its fermentation profile by the human intestinal microbiota in vitro. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fiber**. v. 9, p. 1-6, 2017.

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

CASAS, M.P.; GONZALEZ, H.D. Enzyme-assisted aqueous extraction processes. In: Water Extraction of Bioactive Compounds. **Elsevier**, p. 333-368, 2017.

CASTARDO, J. C.; PRUDENTE, A. S.; FERREIRA, J.; GUIMARÃES, C. L.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL FILHO, V.; CABRINI, D. A. Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 405-411, 2008.

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

CAVALCANTE, I.H.L.; JESUS, N. de; MARTINS, A.B.G. Physical and chemical characterization of yellow mangosteen fruits. **Brazilian Journal of Fruticulture**. v.28, p.325-327, 2006.

CAVELLO, I.; ALBANESI, A.; FRATEBIANCHI, D.; GARMEDIA, G., VERO, S.; CAVALITTO, S. Pectinolytic yeasts from cold environments: new findings of *Guehomyces pullulans*, *Cystofilobasidium infirmominiatum* and *Cryptococcus adeliensis* producing pectinases. **Extremophiles**. v. 21, n. 2, p. 319-329, 2017.

CHAUDHRI, A.; SUNEETHA, V. Microbially derived pectinases: A review. **IOSR Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences**. v. 2, n. 2, p. 1-5, 2012.

CHENG, Z.; CHEN, D.; LU B.; WEI Y.; XIAN L.; LI Y.; HUANG, R. A novel acid-stable endo-polygalacturonase from *Penicillium oxalicum* CZ1028: purification, characterization and application in the beverage industry. **Journal of microbiology and biotechnology**.v. 26, n. 6, p. 989-998, 2016.

CHILIVERI, S.R.; LINGA, V.R. A new thermostable alkaline pectate lyase from *Bacillus tequilensis* SV11 with potential in the textile industry. **Carbohydrate polymers**. v. 111, p. 264-272, 2014.

CHISTÉ, R. C.; FERNANDES, E. Bioactive compounds from Amazonian fruits and their antioxidant properties. **Natural Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables as Health Promoters–Part I**. Bentham Science Publishers, p. 244-264, 2016.

CLAUS, H. Microbial enzymes: relevance for winemaking. In: **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine**. Springer, Cham, 2017. p. 315-338.

CLEMENT, C.R.; WEBER, J.C.; VAN LEEUWEN, J.; ASTORGA DOMIAN, C.; COLE, D.M.; ARÉVALO LOPEZ, L.A.; ARGÜELLO, H. Why extensive research and development has not promoted the use of peach palm fruit in Latin America. **Agroforestry Systems**, v. 61, n. 1, p. 195-206, 2004.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG. 2006.

COMBO, A.M.M.; AGUEDO, M.; GOFFIN, D.; WATHELET, B.; PAQUOT, M. Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations. **Processing of food and bioproducts**. v. 90, n. 3, p. 588-596, 2012.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for the biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action and future perspectives. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

COSTA, A.G.V.; GARCIA-DIAZ, D.F.; JIMENEZ, P.; SILVA, P.I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. **Journal of Functional Foods**. v.5, p.539-549, 2013.

DA COSTA, R.D.S.; DA CRUZ RODRIGUES, A.M.; BORGES LAURINDO, J.; DA SILVA, L.H.M. Development of dehydrated products from peach palm-tucupi blends with edible film characteristics using refractive window. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 560-570, 2019.

DA FONSECA MACHADO, A.P.; DO NASCIMENTO, R.D.P.; DA ROCHA ALVES, M.; REGUENGO, L.M.; JUNIOR, M.R.M. Tucumã-do-Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) and tucumã-do-Pará (*Astrocaryum vulgare*) fruits: bioactive composition, health benefits and technological potential.. **Food Research International** , p. 110902, 2021.

DAL MAGRO, L.; HERTZ, P.F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; KLEIN, M.P.; RODRIGUES, R.C. Preparation and characterization of a Combi-CLEAs from pectinases and cellulases: a potential biocatalyst for grape juice clarification. **CSR advances**. v. 6, n. 32, p. 27242-27251, 2016.

DANALACHE, F.; MATA, P.; ALVES, V.D.; MOLDÃO-MARTINS, M. Enzymatic extraction of fruit juices. In: Fruit juices. **Academic Press**. 2018. p. 183-200.

DAZA, L.D.; FUJITA, A.; GRANATO, D.; FAVARO-TRINDADE, C.S.; GENOVESE, M.I. Functional properties of the encapsulated extract of Cagaita fruit (*Eugenia dysenterica* DC.). **Food Bioscience**. v. 18, p. 15-21, 2017.

DE CASTRO MOREIRA, M. E.; NATAL, D. I. G.; TOLEDO, R. C. L.; RAMIREZ, N. M.; RIBEIRO, S. M. R.; DOS ANJOS BENJAMIN, L.; DOS SANTOS, M. H. Bacupari peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduce high-fat diet-induced obesity in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 143-153, 2017.

DE MELO NETO, B.A.; BARBOSA, A.A.; DOS SANTOS LEITE, C.X.; DE ALMEIDA, P.F.; BONOMO, R.C.F.; PONTES, K.V. Chemical composition and functional properties of starch extracted from peach palm fruit (*Bactris gasipaes* Kunth.). **Acta Scientiarum. Technology**. v. 37, n. 1, p. 105-110, 2015.

DE MELO NETO, B.A.; FERNANDES, B.S.; JUNIOR, C.C.M.F.; FRANCO, M.; BONOMO, R.C.F.; DE ALMEIDA, P.F.; PONTES, K.V. Thermomorphological characterization of the starch from peach palm fruit (*Bactris Gasipaes kunth*) (Pejibaye). **International Journal of Food Properties**. v. 20, n. 5, p. 1007-1015, 2017.

DE MELO PEREIRA, G.V.; MAGALHÃES, K.T.; LORENZETII, E.R.; SOUZA, T.P.; SCHWAN, R.F. A multiphase approach to the identification of endophytic bacteria in strawberry fruits and their potential for promoting plant growth. **Microbial Ecology**. vol. 63, n. 2, p. 405-417, 2012.

DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 55, n. 13, p. 5062-5072, 2007.

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

DE SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; CARNEIRO, J. D. D. S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381-386, 2012.

DEMBITSKY, V.M.; POOVARODOM, S.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; VEARASILP, S.; TRAKHTENBERG, S.; GORINSTEIN, S. The multiple nutrition properties of some exotic fruits: biological activity and active metabolites. **Food Research International**. v.44, p.1671-1701, 2011.

DEWAN, S.S. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. **BCC Research: Wellesly**, MA, USA, 2017.

DEY, A.; KARMAKAR, M.; RAY, R.R. Thermostable extracellular polygalacturonase from *Bacillus* sp. AD 1. **Der Pharmacia Lettre**. v. 3, n. 2, p. 358-367, 2011.

DHIMAN, J.; AHMAD, S.; GULIA, K. Comparison between Adaptive filter Algorithms (LMS, NLMS and RLS). **International journal of science, engineering and technology research (IJSETR)**. v. 2, n. 5, p. 1100-1103, 2013.

DIAS, M.; DA CRUZ PEDROZO MIGUEL, M.G.; DUARTE, W.F.; SILVA, C.F.; SCHWAN, R.F. Biodiversity of epiphytic bacteria in Brazilian Cerrado fruits and their potential for cellulolytic activity. **Annals of microbiology**. vol. 65, n. 2, p. 851-864, 2015.

DOAN, C.T.; CHEN, C.L.; NGUYEN, V.B.; TRAN, T.N.; NGUYEN, A.D AND WANG, S.L.; Conversion of pectin-containing by-products into pectinases by *Bacillus amyloliquefaciens* and their applications in the hydrolysis of banana peels for the production of prebiotics. **Polymers**, v. 13, no. 9, p. 1483, 2021.

DONADIO, L. C.; MORO, F.V.; SERVIDONE, A.A. Frutas brasileiras. Jaboticabal: Funep, 2002. 288p.

DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; TEIXIDÓ, N.; SPADARO, D.; JIJAKLI, M.H. The science, development and commercialization of post-harvest biocontrol products. **Postharvest Biology and Technology**. v. 122, p. 22-29, 2016.

DUARTE, O. Achachairú (*Garcinia humilis* (Vhal) C. D. Adam). **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Açaí to Citrus**, v.54, p.48-53, 2011.

EGAMBERDIEVA, D.; DAVRANOV, K.; WIRTH, S.; HASHEM, A.; ABDALLAH, E.F. Impact of soil salinity on plant growth promotion abilities and biological control of root-associated bacteria. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 24, n. 7, p. 1601-1608, 2017.

ELLIAIAH, P.; ADINARAYANA, K.; BHAVANI, Y.; PADMAJA, P.; SRINIVASULU, B. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. **Process Biochemistry**. vol. 38, no. 4, p. 615-620, 2002.

ERKAN-KOÇ, B.; TÜRKYILMAZ, M.; YEMİŞ, O.; ÖZKAN, M. Effects of various protein- and polysaccharide-based clarifying agents on antioxidant compounds and the color of pomegranate juice. **Food Chemistry**. v. 184, p. 37-45, 2015.

ESPINOSA-PARDO, F. A.; MARTINEZ, J.; MARTINEZ-CORREA, H. A. Extraction of bioactive compounds from peach pulp (*Bactris gasipaes*) using supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 93, p. 2-6, 2014.

EVANGELISTA, D.E.; DE PAULA, F.F.P.; RODRIGUES, A.; HENRIQUE-SILVA, F. Pectinases from *Sphenophorus levis* Vaurie, 1978 (Coleoptera: Curculionidae): putative accessory digestive enzymes. **Journal of Insect Science**. v. 15, n. 1, 2015.

FELISBERTO, M.H.F.; COSTA, M.S.; BOAS, F.V.; LEIVAS, C.L.; FRANCO, C.M.L.; DE SOUZA, S.M.; CORDEIRO, L.M.C Characterization and technological properties of peach palm fruit starch (*Bactris gasipaes* var. *gasipaes*). **Food research international**. v. 136, p. 109569, 2020.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Science and Agrotechnology**. v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FESSARD, A.; REMIZE, F. Genetic and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from fruits and vegetables grown in a tropical climate. **International Journal of Food Microbiology**. v. 301, p. 61-72, 2019.

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

FLORES, M.E.; PÉREZ, R.; HUITRON, C. Characterization and production of β -xylosidase and xylanase by *Streptomyces* sp. CH - M - 1035. **Letters in applied microbiology**.v. 24, n. 5, p. 410-416, 1997.

FRANKLIN, B., DO NASCIMENTO, F.D.C.A. Plants for the future: compilation of data on the nutritional composition of araçá-boi, buriti, cupuaçu, murici and peach palm. **Brazilian Development Magazine**. v. 6, n. 3, p. 10174-10189, 2020.

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

GARZON, G.A.; NARVÁEZ-CUENCA, C.-E.; KOPEC, R.E.; BARRY, A.M.; RIEDL,

K.M.; SCHWARTZ, S.J. Determination of carotenoids, total phenolic content, and antioxidant activity of Arazá (*Eugenia stipitata* McVaugh), an Amazonian fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.60, p.4709-4717, 2012.

GENGATHARAN, A.; DYKES, G.; CHOO, W.S. Betacyanins from *Hylocereus polyrhizus*: pectinase-assisted extraction and application as a natural food coloring in ice cream. **Journal of Food Science and Technology**. v. 58, n. 4, p. 1401-1410, 2021.

GERVAIS, P.; MOLIN, P. The role of water in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.85-101, 2003.

GHANDAHARI YAZDI, A.P.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M.A.; AHMADI GAVLIGHI, H. Optimization of enzyme-assisted aqueous extraction of phenolic compounds from pistachio green shell. **Food science and nutrition**. v. 7, n. 1, p. 356-366, 2019.

GHORAI, S.; BANIK, S.P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed processing. **Food research international**. v. 42, n. 5-6, p. 577-587, 2009.

GHOSH, D.; BISWAS, P.K. Enzyme-assisted extraction of carotenoids from pumpkin tissues. **Indian Chemical Engineer**. v. 58, n. 1, p. 1-11, 2016.

GIOVANNUCCI, E.; RIMM, E.B.; LIU, Y.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C. A prospective study of tomato products, lycopene and prostate cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 94, n. 5, p. 391-398, 2002.

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

GOVINDARAJI, P. K.; VUPPU, S. Characterisation of pectin and optimization of pectinase enzyme from novel *Streptomyces fumigatiscleroticus* VIT-SP4 for drug delivery and concrete crack-healing applications: An eco-friendly approach. **Saudi journal of biological sciences**. v. 27, n. 12, p. 3529-3540, 2020.

GRAEFE, S., DUFOUR, D., VAN ZONNEVELD, M., RODRIGUEZ, F., & GONZALEZ, A. Peach palm (*Bactris gasipaes*) in tropical Latin America: implications for biodiversity conservation, natural resource management and human nutrition. **Biodiversity and conservation**, v. 22, n. 2, p. 269-300, 2013.

GRONDIN, E.; SING, A.S.C.; CARO, Y.; RAHERIMANDIMBY, M.; RANDRIANIERENANA, A.L.; JAMES, S.; PETIT, T. Comparative study of the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits in the production of flavoring compounds. **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 203, p. 101-108, 2015.

GU, J.; LV, Z.; WU, Y.; GUO, Y.; TIAN, L.; QIU, H.; ZHANG, Q. Dielectric thermally conductive boron nitride/polyimide composites with outstanding thermal stabilities via in-situ polymerization-electrospinning-hot press method. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**, v. 94, p. 209-216, 2017.

- GUAN, T.W.; LIN, Y.J.; OR, M.Y.; CHEN, K.B. Isolation and diversity of sedimentary bacteria in Aiding Hypersaline Lake, China. **PloS one**, v. 15, n. 7, p. 0236006, 2020.
- GUIMARÃES, C. L. et al. Uma revisão sobre o potencial terapêutico da *Garcinia gardneriana*-NA. **Dynamis Revista Tecno-Científica**, v.12, n.48, p.6-12, 2004.
- GUO, J.; YAN, Y.; WANG, M.; WU, Y.; LIU, S.Q.; CHEN, D.; LU, Y. Effects of enzymatic hydrolysis on the chemical constituents of the alcoholic beverage from jujube fermented with *Torulaspora delbrueckii*. **Lwt**, v. 97, p. 617-623, 2018.
- GUSTAFSON K.R.; BLUNT J.W.; MUNRO M.H.; FULLER R.W.; MCKEE T.C.; CARDELLINA I.I.; J.H; MCMAHON J.B.; CRAGG G.M.; BOYD M.R. The gutiferones, HIV-inhibiting benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**. v. 48, n. 46, p. 10093-102,1992.
- HABRYLO, O.; EVANGELISTA, D.E.; CASTILHO, P.V.; PELLOUX, J.; HENRIQUE-SILVA, F. *Sphenophorus levis* pectinases: Potential for biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 112, p. 499-508, 2018.
- HAILE, M.; KANG, W. H. bIsolation, identification, and characterization of pectinolytic yeasts for starter culture in coffee fermentation. **Microorganisms**, v. 7, n. 10, p. 401, 2019.
- HAMINIUK, C.W.; MACIEL, G.M.; PLATA-OVIEDO, M.S.; PERALTA, RM. Phenolic compounds in fruit – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 47, n. 10, p. 2023-2044, 2012.
- HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; VIBE SCHELLER, H. Pectin biosynthesis. **Pant physiology**. v. 153, n. 2, pág. 384-395, 2010.
- HASSAN, B.; ALI, S. HASSAN, BEENISH; ALI, SIKANDER. A review on biotechnological impact of pectinases in industries. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 1, n. 2, p. 1-16, 2016.
- HASSAN, M.A.; ABOL-FOTOUH, D.; OMER, A.M.; TAMER, T.M.; ABBAS, E. Comprehensive insights into microbial keratinases and their implication in various biotechnological and industrial sectors: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 154, p. 567-583, 2020.
- HIGBY, W.K. A simplified method for determining some aspects of carotenoid distribution in natural and carotene-fortified orange juice. **Journal of Food Science**. v. 27, n. 1, p. 42-49, 1962.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STANLEY, J.T. AND WILLIAM, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. **Williams and Wilikins**, Baltimore, 786-788, 1994.
- HOSSAIN, N.; ZAINI, J.H.; MAHLIA, T.M.I A review of bioethanol production from plant residue biomass by yeast fermentation. **International Technology Magazine**. 2017.

HU, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; XIONG, H.; WANG, F.; WANG, Y., & Lu, Z. Effects of starch and gelatin encapsulated vitamin A on growth performance, immune status and antioxidant capacity in weaned piglets. **Animal Nutrition**, v. 6, n. 2, p. 130-133, 2020.

HUO, S.; WANG, Z.; CUI, F.; ZOU, B.; ZHAO, P.; YUAN, Z. Enzyme-assisted extraction of oil from wet microalgae *Scenedesmus* sp. G4. **Energies**, v. 8, n. 8, p. 8165-8174, 2015.

IBIAPINA, A.; GUALBERTO, L. D. S.; DIAS, B. B.; FREITAS, B. C. B.; MARTINS, G. A. D. S.; MELO FILHO, A. A. Essential and fixed oils from Amazonian fruits: proprieties and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-13, 2021.

IBRAHIM, D.; WELOOSAMY, H.; LIM, S. H. Effect of agitation speed on the morphology of *Aspergillus niger* HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation. **World journal of biological chemistry**, v. 6, n. 3, p. 265, 2015.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V.I. Critical review of methods for characterizing polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food chemistry**. vol. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

IONTA, M.; FERREIRA-SILVA, G.A.; NIERO, E.L.; COSTA, E.D.M, MARTENS, A.A, ROSA, W.; .SANTOS, M.H. A 7-Epiclusianone, a benzophenone extracted from *Garcinia brasiliensis* (Clusiaceae), induces cell cycle arrest at the G1/S transition in A549 cells. **Molecules**.v. 20, n. 7, p. 12804-12816, 2015.

JALALI-JIVAN, M.; ABBASI, S.; FATHI-ACHACHLOUEI, B. Lutein extraction by the microemulsion technique: Evaluation of stability versus thermal processing and environmental stresses. **Lwt**. v. 149, p. 111839, 2021.

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

JIANG, X.; LU, Y. E.; LIU, S.Q. Effects of pectinase treatment on the physicochemical and enological properties of pitaya red wine fermented with *Torulaspora delbrueckii*. **Lwt**. v. 132, p. 109929, 2020.

JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, C.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; MARTI, N.; SAURA, D.; VALERO, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Characterization of polyphenols, sugars and other polar compounds in persimmon juices produced under different technologies and their evaluation in terms of composition variations. **Food Chemistry**, v. 182, p. 282-291, 2015.

JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, C.; LOZANO-SÁNCHEZ, J.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Alternatives to conventional heat treatments in fruit juice processing. Part 2: Effect on composition, phytochemical content and physicochemical, rheological and organoleptic properties of fruit juices. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 57, n. 3, p. 637-652, 2017.

JIN, G.; YANG, F.; H.U., C.; SHEN, H.; ZHAO, Z.K. Enzyme-assisted extraction of lipids directly from the culture of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. **Bioresource technology**, v. 111, p. 378-382, 2012.

- JOHN, J.; KAIMAL, K. S.; SMITH, M. L.; RAHMAN, P. K.; CHELLAM, P. V. Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.
- JUNIOR, G. C. A. C.; DO ESPÍRITO-SANTO, J. C. A.; FERREIRA, N. R., MARQUES-DA-SILVA, S. H.; OLIVEIRA, G.; VASCONCELOS, S.; LOPES, A. S. Yeast isolation and identification during on-farm cocoa natural fermentation in a highly producer region in northern Brazil. **Scientia Plena**, v. 16, n. 12, 2020.
- KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource technology**. v. 77, p. 215–227, 2001.
- KASSARA, S., LI, S.; SMITH, P.; BLANDO, F.; BINDON, K. The pectolytic enzyme reduces the concentration of colloidal particles in wine due to changes in the polysaccharide structure and aggregation properties. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 140, p. 546-555, 2019.
- KATOUZIAN, I.; ESFANJANI, A.F.; JAFARI, S.M.; AKHAVAN, S. Formulation and application of a new generation of lipid nanocarriers for bioactive food ingredients. **Trends in Food Science and Technology**. v. 68, p. 14-25, 2017.
- KAUL, S.; SHARMA, T.; K DHAR, M. —Omics tools for better understanding of plant-endophyte interactions. **Frontiers in plant science**. v. 7, p. 955, 2016.
- KAVUTHODI, B.; SEBASTIAN, D. Review on bacterial production of alkaline pectinase with special emphasis on *Bacillus* species. **Biosci. Biotechnol. Res. Commun.** v. 11, p. 18-30, 2018.
- KC, S.; UPADHYAYA, J.; JOSHI, D. R.; LEKHAK, B.; KUMAR CHAUDHARY, D.; RAJ PANT, B.; RAGHAVAN, V. Production, characterization, and industrial application of pectinase enzyme isolated from fungal strains. **Fermentation**, v. 6, n. 2, p. 59, 2020.
- KHAN, A.L.; HAMAYUN, M.; KANG, S.M.; KIM, Y.H.; JUNG, H.Y.; LEE, J.H.; LEE, I.J. The association of endophytic fungi via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC microbiology**. v. 12, n. 1, p. 1-14, 2012.
- KHODDAMI, A.; WILKES, M.A.; ROBERTS, T.H. Techniques for analyzing plant phenolic compounds. **Molecules**. v. 18, n. 2, p. 2328-2375, 2013.
- KIERS, E.T.; DUHAMEL, M.; BEESETTY, Y.; MENSAH, J.A.; FRANKEN, O.; VERBRUGGEN, E.; BÜCKING, H. Reciprocal rewards stabilize cooperation in mycorrhizal symbiosis. **Science**. v. 333, no. 6044, pg. 880-882, 2011.
- KOHLI, P.; GUPTA, R. Alkaline pectinases: a review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 279-285, 2015.
- KOSHY, M.; DE, S. Effect of *Bacillus tequilensis* SALBT crude extract with pectinase activity on demucilation of coffee beans and juice clarification. **Journal of basic microbiology**, v. 59, n. 12, p. 1185-1194, 2019.

KUMAR Y.S.; KUMAR P.V.; REDDY O.V. Produção de pectinase a partir da casca de manga utilizando *Aspergillus foetidus* e sua aplicação no processamento de suco de manga. **Food Biotechnology**. v. 26, n. 2, p.107-123, 2012.

KUMAR, A.; SHARMA, R. Production of alkaline pectinase by bacteria (Cocci sps.) isolated from decomposing fruits. **Journal of Phytology**. v. 4, n. 1, p. 1-5, 2012.

KWON, S.J.; SON, J.H.; PARK, K.C.; O.H.; H.Y.; KIM, P.H.; BYEON, W.H.; KIM, N.S. Structural dynamics and divergence of the polygalacturonase gene family in terrestrial plants. **Nature Precedent**. p. 1-1, 2008.

LATIF, Z.; SOHAIL, M. Molecular characterization of polygalacturonase-producing *Klebsiella* and *Staphylococcus* species by sequencing of 16S rRNA collected from rotten fruits and vegetables. **African Journal of Research in Microbiology**, v. 6, n. 46, p. 7319-7323, 2012.

LA SCOLA, B.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; JUNGANG, L.; DE LAMBALLERIE, X.; DRANCOURT, M.; BIRTLES, R.; CLAVERIE, J. M.; RAOULT, D.; A giant virus in amoebae. **Science**, p. 2033, 2003.

LANG C.; YANG R.; YANG Y. GAO B.; ZHAO L. WEI W.; WEI D. An Endo- α -1,5-l-arabinanase Acid-Adapted for Pectin Release. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 180, n. 5, p. 900-916, 2016.

LANG, C.; DÖRNENBURG, H. Perspectives on the biological function and technological application of polygalacturonases. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 53, n. 4, p. 366-375, 2000.

LENUCCI, M.S.; DE CAROLI, M.; MARRESE, P.P.; IURLARO, A.; RESCIO, L., BÖHM, V.; PIRO, G. Lycopene enzyme-assisted extraction from tomato cultivars with high pigment by supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v. 170, p. 193-202, 2015.

LENUCCI, M.S.; DE CAROLI, M.; MARRESE, P.P.; IURLARO, A.; RESCIO, L., BÖHM, LIMA, A. C. M.; SANTOS, I. L.; BASTOS, L. T. A. DE ALMEIDA, A. F. in: DE ALMEIDA, A. F.; DO AMARAL C. C. A. Frutos Amazônicos: Biotecnologia e Sustentabilidade. **EDUFT**, v. 1, n. 24, p. Lv24-Lv24, 2020.

LINARES-MORALES, J.R.; CUELLAR-NEVÁREZ, G.E.; RIVERA-CHAVIRA, B.E.; GUTIÉRREZ-MÉNDEZ, N.; PÉREZ-VEGA, S.B.; NEVÁREZ-MOORILLÓN, G.V. Selection of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables based on their antimicrobial and enzymatic activities. **Food**. v. 9, n. 10, p. 1399, 2020.

LIU, H.; CHEN, W.; WU, M.; WU, R., ZHOU, Y.; GAO, Y.; REN, A. Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi reduces the drought resistance advantage of endophyte-infected versus endophyte-free *Leymus chinensis*. **Mycorrhiza**. v. 27, n. 8, p. 791-799, 2017.

LIU, J.; ZHANG, L.; JIA, Y.; HU, W., ZHANG, J.; JIANG, H. Preparation and evaluation of pectin-based colon-specific pulsatile capsule in vitro and in vivo. **Pharmaceutical Research Archives**. v. 35, no. 11, p. 1927-1934, 2012.

LIU, M., YANG, K., QI, Y. FAN, M.; WEI, X. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of persimmon wine by pectinase addition technology and different pre-maceration. **Journal of Food Processing and Preservation**. v. 42, n. 2, p. 13452, 2018.

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

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. Brazilian and exotic cultivated fruits (in natura consumption). **São Paulo: Plantarum Institute for Flora Studies**. 2006.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, p. 265-275, 1951.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; Protein LU, X.; LIN, J.; WANG, C.; DU, X.; CAI, J. Purification and characterization of exopolygalacturonase from *Zygoascus hellenicus* V25 and its potential application in the clarification of fruit juices. **Food science and biotechnology**. v. 25, n. 5, p. 1379-1385, 2016.

MA, S.; NEILSON, A.; LAHNE, J.; PECK, G.; O'KEEFE, S.; HURLEY, E.K.; STEWART, A. Juice clarification with pectinase reduces yeast assimilable nitrogen in apple juice without affecting the polyphenol composition in cider. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 11, p. 2772-2781, 2018.

MAC FADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. **Baltimore: Williams & Wilkins**. 312p, 1976.

MAC FADDIN, J.F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. **Baltimore: Williams & Wilkins**. 312p, 1977.

MACCHERONI JUNIOR, W.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. *Scientia Agricola*, v. 61, n. 3, p. 298-302, 2004.

MADBOULY, A.K.; ELYOUSR, K.A.A.; ISMAIL, I.M. Biocontrol of *Monilinia fructigena*, causal agent of apple brown rot, using endophytic yeasts. **Biological control**, vol. 144, p. 104239, 2020.

MAIA, N.L.; DE BARROS, M.; DE OLIVEIRA, L.L.; CARDOSO, S.A.; DOS SANTOS, M.H.; PIERI, F.A.; MOREIRA, M.A. Synergism of plant compost with traditional antimicrobials against *Streptococcus* spp. isolated from bovine mastitis. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, p. 1203, 2018.

MAIA, G. C. H. M.; CAMPOS, M. S.; BARROS-MONTEIRO, J.; CASTILLO, J. E. L.; FALEIROS, M. S.; SALES, R. S. A.; GALENO, D. M. L.; LIRA, E.; SOUZA, F. C. A.; ORTIZ, C.; MORALES L.; CARVALHO, R. P. Effects of *Astrocaryum aculeatum* Meyer (*Tucumã*) on diet-induced dyslipidemic rats. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2014, 2014.

MARATHE, S.J.; JADHAV, S.B.; BANKAR, S.B.; DUBEY, K.K.; SINGHAL, R.S. Improvements in the extraction of bioactive compounds by enzymes. **Current Opinion in Food Science**. v. 25, p. 62-72, 2019.

MARIĆ, M.; GRASSINO, A.N.; ZHU, Z.; BARBA, F.J.; BRNČIĆ, M.; BRNČIĆ, S.R. An overview of traditional and innovative approaches to extracting pectin from plant food residues and by-products: ultrasound, microwave and enzyme-assisted extraction. *Trends in Food Science & Technology*, v. 76, p. 28-37, 2018.

MARINHO, T. A. D. S.; LOPES, A.; ASSIS, R. L. D; RAMOS, S. L. F.; GOMES, L. R. P.; WITTMANN, F.; SCHÖNGART, J. Distribution and growth of *Garcinia brasiliensis* Mart. and *Hevea spruceana* (Benth.) Müll. Arg. in a flooded forest in Manaus, Amazonas. **Forest Science**. v. 23, p. 223-232, 2013.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; YANG, C.H. Development of specific bacterial communities in the rhizosphere in relation to plant species, nutrition and soil type. **Plant and Soil**. v. 261, n. 1, p. 199-208, 2004.

MARTÍN, M.C.; LÓPEZ, O.V.; CIOLINO, A.E.; MORATA, V.I.; VILLAR, M.A.; NINAGO, M.D. Immobilization of enological pectinase in calcium alginate hydrogels: a potential biocatalyst for winemaking. **Biocatalysis and agricultural Biotechnology**. v. 18, p. 101091, 2019.

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

MARTINS, E.S.; SILVA, D.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**. v. 37, n. 9, p. 949-954, 2002.

MARTOS, M.A.; BUTIUK, A.P.; ROJAS, N.L.; HOURS, R.A. Purification and Characterization of a Polygalacturonase Produced by *Wickerhamomyces anomalus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 57, p. 587-594, 2014.

MARQUES, H.P.; BARBOSA, S.; NOGUEIRA, D.A.; SANTOS, M.H.; SANTOS, B.R.; SANTOS-FILHO, P.R. Contents of protein and phenolic compounds in callus of *Bacupari* cultivated with sources of glutamine and nitrogen. **Brazilian Journal of Biology**. v. 78, p. 41-46, 2017.

MASOUD W.; CESAR L.B.; JESPERSEN L, JAKOBSEN M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**. 2004; 21: 549–556.

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

MAZZEI, R., GEBREYOHANNES, A.Y.; PAPAIOANNOU, E.; NUNES, S.P.; VANKELECOM, IF.; GIORNO, L. Enzymatic catalysis with artificial membranes for process intensification in biorefinery-A review. **Bioresource Technology**. p. 125248, 2021.

MEDEIROS, L.S.D.; SAMPAIO, O.M.; DA SILVA, M.F.D.G.; RODRIGUES FILHO, E.; VEIGA, T.A.M. Evaluation of the herbicidal potential of *Cladosporium uredinicola* depsides, an endophytic fungus found in guava. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 23, n. 8, p. 1551-1557, 2012.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J. An overview of carotenoids, apocarotenoids and vitamin A in food, nutrition, health and disease. *Molecular nutrition and food research*, v. 63, n. 15, p. 1801045, 2019.

MELO, A. M.; BARBI, R. C. T.; COSTA, B. P.; IKEDA, M.; CARPINÉ, D.; RIBANI, R. H. Valorization of the agro-industrial by-products of bacupari (*Garcinia brasiliensis* (Mart.)) through production of flour with bioactive properties. **Food Bioscience**. p. 101343, 2021.

MENEGHEL, L.; REIS, G.P.; REGINATTO, C.; MALVESSI, E.; DA SILVEIRA, M.M. Evaluation of pectinase production by *Aspergillus oryzae* in growth-limiting liquid medium under limited and non-limited oxygen supply. **Process Biochemistry**. v. 49, n. 11, pág. 1800-1807, 2014.

MERCADO-BLANCO, J.; PRIETO, P. Endophytic bacteria and root hairs. **Plant and Soil**. v. 361, n. 1, p. 301-306, 2012.

MERCIMEK TAKCI, H. A.; TURKMEN, F. U. Extracellular pectinase production and purification from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. **International journal of food properties**, v. 19, n. 11, p. 2443-2450, 2016.

MERÍN, M.G.; DE AMBROSINI, V.I.M. Kinetic and metabolic behavior of the pectinolytic strain *Aureobasidium pullulans* GM-R-22 during pre-fermentative cold maceration and its effect on red wine quality. **International Journal of Food Microbiology**, v. 285, p. 18-26, 2018.

MERÍN, M.G.; MARTÍN, M.C.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; DE AMBROSINI, V.I.M. Characterization of pectinase activity for the enology of Bonarda argentina grape yeasts. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 46, p. 815-823, 2015.

MERÍN, M.G.; MORATA DE AMBROSINI, V.I. Application of a major pectinolytic species on the grape surface, *Aureobasidium pullulans*, in the vinification of low-temperature red wines: development and stability of wine color. **Journal of Wine Research**. v. 31, n. 3, p. 218-239, 2020.

MERÍN, M.G.; MORATA DE AMBROSINI, V.I. Highly active pectinases in cold under wine conditions of non-Saccharomyces yeasts for enzyme production during vinification. **Letters in Applied Microbiology**. v. 60, n. 5, p. 467-474, 2015.

MIGUEL, M.G.D.C.P.; DE CASTRO REIS, L.V.; EFRAIM, P.; SANTOS, C.; LIMA, N.; SCHWAN, R.F. Fermentação do cacau: Identificação microbiana por MALDI-TOF MS e avaliação sensorial do chocolate produzido. **LWT**. v. 77, p. 362-369, 2017.

MILANI, A.; BASIRNEJAD, M.; SHAHBAZI, S.; BOLHASSANI, A. Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. **British Journal of Pharmacology**. v. 174, n. 11, p. 1290-1324, 2017.

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

MIRZAAGHAEI, M.; GOLI, S.A.H.; FATHI, M. Application of sepiolite in the clarification of pomegranate juice: changes in quality characteristics during the process. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 51, n. 7, p. 1666-1673, 2016.

MOHANDAS, A.; RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; ABRAHAM, A.; ATHIRA, R. S., KURUVILLA MATHEW, A.; PANDEY, A. Production of pectinase from *Bacillus sonorensis* MPTD1. **Food technology and biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 110-116, 2018.

MONTERO, I.F.; SARAVIA, S.A.M.; SANTOS, R.A.; DOS SANTOS, R.C.; MARCIA, J.A.F.; DA COSTA, H.N.R. Nutrients in Amazonian fruit pulp with functional and pharmacological interest. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 14, n. 5, p. 118-127, 2020.

MOYO, S.; GASHE, B.A.; COLLISON, E.K.; MPUCHANE, S. Optimizing growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**. v. 85, no. 1-2, p. 87-100, 2003.

MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds; A review. **Pharmaceuticals**. v. 3, n. 4, p. 793-829, 2011.

MURADOR, D.C.; DE SOUZA MESQUITA, L.M.; VANNUCHI, N., BRAGA, A.R.C.; DE ROSSO, V.V. Bioavailability and biological effects of bioactive compounds extracted with natural deep eutectic solvents and ionic liquids: Advantages over conventional organic solvents. **Current Opinion in Food Science**. v. 26, p. 25-34, 2019.

MOREIRA, M. E. C.; NATAL, D. I. G.; TOLEDO, R. C. L.; RAMIREZ, N. M., RIBEIRO, S. M. R.; DOS ANJOS BENJAMIN, L.; MARTINO, H. S. D. Bacupari peel extracts (*Garcinia brasiliensis*) reduce high-fat diet-induced obesity in rats. **Journal of Functional Foods**. v. 29, p. 143-153, 2017.

MURUGAN, T.; DEEPIKA, P., KOWSALYA, A.; SIVASUBRAMANIAN, K.; REJISHA, R.P., MURUGAN, M.; WINS, J.A. Production and characterization of extracellular pectinase from a *Bacillus* species freshly isolated from fruit residue soil. **Materials Today: Annals**. v. 45, p. 2087-2090, 2021.

MUTTER, M.; BELDMAN, G.; PITSON, S.M.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G. Rhamnogalacturonan α -D-galactopyranosyluronohydrolase: an enzyme that specifically removes the terminal non-reducing galacturonosyl residue in rhamnogalacturonan regions of pectin. **Plant physiology**. v. 117, n. 1, p. 153-163, 1998.

NADAR, S.S.; RAO, P.; RATHOD, V.K. Enzyme-assisted extraction of biomolecules as an approach to new extraction technology: A review. **Food Research International**. v. 108, p. 309-330, 2018.

NADAR, S.S.; RATHOD, V.K. Co-immobilization of pectinase and cellulase in magnetic nanoparticles for extracting antioxidants from fruit peels. **Biocatalysis and agricultural Biotechnology**. v. 17, p. 470-479, 2019.

NAIDU, G.S.N.; PANDA, T. Production of pectinolytic enzymes- A review. **Bioprocess Engineering**. v. 19, p. 355-361, 1998.

NALDONI, F.J.; CLAUDINO, A.L.R.; CRUZ J.R.; J.W.; CHAVASCO, J.K.; AND SILVA, P.F.; VELOSO, M.P.; SANTOS, M.D. Antimicrobial activity of benzophenones and fruit extracts of *Garcinia brasiliensis*. **Medicinal food magazine**, v. 12, n. 2, p. 403-407, 2009.

NATH, P.; KAUR, C.; RUDRA, S. G.; VARGHESE, E. Enzyme-assisted extraction of carotenoid-rich extract from red capsicum (*Capsicum annum*). **Agricultural Research**, v. 5, n. 2, p. 193-204, 2016.

NAUMOV, G.I.; SHALAMITSKIY, M.Y.; NAUMOVA, E.S. New PGU1b–PGU3b pectinase gene family from the pectinolytic yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. In: **Doklady Biochemistry and Biophysics. Pléiades Publisher**. v. 467, n. 1, p. 89-91, 2016.

NAVES, V.M.L.; DOS SANTOS, M.H.; RIBEIRO, I.S.; DA SILVA, C.A.; SILVA, N.C.; DA SILVA, M.A.; DIAS, D.F. Antimicrobial and antioxidant activity of *Garcinia brasiliensis* extracts. **South African Journal of Botany**. v. 124, p. 244-250, 2019.

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

NIERO R, D.A.L.; MOLIN M.M.; SILVA S.; DAMIAN N.S.; MAIA L.O.; DELLE MONACHE F.; CECHINEL FILHO V.; DE ANDRADE S.F. Gastroprotective effects of extracts and gutiferone A isolated from *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) against experimentally induced gastric lesions in mice. **Naunyn-Schmiedeberg Pharmacology Archives**. v. 385, n.11, p.1103-9, 2012.

NERI-NUMA, I. A., SANCHO, R. A. S., PEREIRA, A. P. A., PASTORE, G. M. Small Brazilian wild fruits: Nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Research International**, v. 103, p. 345-360, 2018.

NIKHANJ, P.; KOCHER, G.S.; BOORA, R.S. Fermentative production of guava wine from the juice treated and not treated with pectinase of the cultivar 'punjab pink' of *Psidium guajava* L. **Agricultural Research Journal**. v. 54, n. 2, p. 244-247, 2017.

NORSHAZILA, S.; KOY, C.N.; RASHIDI, O.; HO, L.H.; AZRINA, I.; ZAIZULIANA, N.R.; ZARINAH, Z. The effect of time, temperature and solid-solvent ratio on pumpkin carotenoids extracted using food-grade solvents. **Sains Malaysiana** , v. 46, n. 2, pág. 231-237, 2017.

ORDÓÑEZ-SANTOS, L. E.; PINZÓN-ZARATE, L. X.; GONZÁLEZ-SALCEDO, L. O. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) by-products with sunflower oil using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, 27, 560-566, 2015.

ORTIZ, C.; MORALES L.; CARVALHO, R. P. Effects of *Astrocaryum aculeatum* Meyer (*Tucumã*) on diet-induced dyslipidemic rats. **Journal of nutrition and metabolism**. v. 2014, 2014.

OUMER, O. J.; ABATE, D. Screening and molecular identification of pectinase producing microbes from coffee pulp. **BioMed research international**. v. 2018, 2018.

ÖZKAN, G.; BILEK, S. E. Enzyme-assisted extraction of stabilized chlorophyll from spinach. **Food chemistry**. v. 176, p. 152-157, 2015.

PAGLARINI, C. S.; PINTO, E. G.; SILVA, F. S.; PORTO, A.G.; LEITE, A. L. M. P. análise físico-química e comportamento reológico da polpa de bacupari (*Rheedia gardneriana* Tr. & Planch.) **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**. Centro Científico Conhecer-Goiânia, v.8, N.14; p. 2012.

PALMERÍN-CARREÑO, D.M.; RUTIAGA-QUIÑONES, O.M.; CALVO, J.V.; PRADO-BARRAGÁN, A. E.; HUERTA-OCHOA, S. Screening of microorganisms for bioconversion of (+) - valencene to (+) - nootkatone. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 788-793, 2015.

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

PARDO-ANDREU, G. L.; NUÑEZ-FIGUEREDO., Y.; TUDELLA V.G.; CUESTA-RUBIO O.; RODRIGUES , F.P.; PESTANA ; C.R.; UYEMURA S. A.;LEOPOLDINO, A.M.; ALBERICI, L. C.; CURTI C. The anticancer agent gutiferone-A permeabilizes the mitochondrial membrane: implications of subsequent energy and oxidative stress. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 253, n. 3, p.282-289 2011.

PATIDAR, M. K.; NIGHOJKAR, S.; KUMAR, A.; NIGHOJKAR, A. Pectinolytic enzymes-solid state fermentation, assay methods and applications in fruit juice industries: a review. **3 Biotech**, v. 8, n. 4, p. 199, 2018.

PAULDAS, K.; JAIN, A. Optimization of pectinase production kinetics by *Candida tropicalis* and its applications in fruit juice clarification. **International Journal of Pharmacy and Biological Science**. v. 8, n. 3, p. 946-958, 2018.

PEDROLI, D. B.; MONTEIRO, A. C.; GOMES, E.; CARMONA, E. C. Pectin and Pectinases: Production, Characterization and Industrial Application of Microbial Pectinolytic Enzymes. **The Open Biotechnology Journal**.v. 3, p. 9-18, 2009.

PEREIRA, I.O.; MARQUES, M.J.; PAVAN, A.L.R.; CODONHO, B.S.; BARBIÉRI, C.L.;

BEIJO, L.A.; DOS SANTOS, M.H. Leishmanial activity of benzophenones and extracts of *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine**. v. 17, n. 5, p. 339-345, 2010.

PEREIRA, V. M. Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.)Wehmer. 2012. 111p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG.

PHUTELA, U. ; DHUNA, V.; SANDHU, S.; CHADHA, B. S. (2005). Pectinase and polygalacturonase production by a thermophilic *Aspergillus fumigatus* isolated from decomposing orange peels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 63-69, 2005.

PICCINELLI, A.L.; CUESTA-RUBIO, O.; CHICA, M.B.; MAHMOOD, N.; PAGANO, B.; PAVONE, M.; RASTRELLI, L. Structural review of clusianone and 7-epi-clusianone and activity anti-HIV of polyisoprenylated benzophenones. **Tetrahedron**. v. 61, n. 34, pg. 8206-8211, 2005.

PICOT-ALLAIN, M.C.N.; RAMASAWMY, B.; EMMAMBUX, M.N. Extraction, characterization and application of pectin from tropical and subtropical fruits: a review. **Food Reviews International**. p. 1-31, 2020.

PINELO, M.; ZEUNER, B.; MEYER, A.S. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. **Processing of food and bioproducts**. v. 88, n. 2-3, p. 259-265, 2010.

PITT, M. Pectin lyase from *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, **Methods Enzymol.**, v. 161, p. 350-354, 1988.

POONDLA, V.; BANDIKARI, R.; SUBRAMANYAM. R.; OBULAM, A. S. R. Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v.4, p.70 - 76, 2015.

POTURCU, K.; OZMEN, I.; BIYIK, H.H. Caracterização de uma pectina liase alcalina termoestável de *Aspergillus niger* _WHAK1 recém-isolada e sua aplicação na clarificação de sucos de frutas. **Arabian Journal for Science and Engineering**. v. 42, n. 1, pág. 19-29, 2017.

POVEDA, G.; GIL-DURAN, C.; VACA, I.; LEVICAN, G.; CHÁVEZ, R. Cold pectinolytic activity produced by filamentous fungi associated with Antarctic sea sponges. **Biological Research**. v. 51, 2018.

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

PRETORIUS, I.S.S. Adapting Wine Yeast for the New Millennium: New Approaches to the Ancient Art of Winemaking. **Yeast**. v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

PRIYA V, SASHI V. Microorganisms producing pectinase enzyme 1. **Int J Sci Res Pub**. n. 3, p, 1–4, 2014.

PRIYADHARSINI, P.; MUTHUKUMAR, T. The endophytic root fungus *Curvularia geniculata* from the roots of *Parthenium hysterophorus* improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production. **Fungal Ecology**. v. 27, p. 69-77, 2017.

PURI, M.; SHARMA, D.; BARROW, C.J. Enzyme-assisted extraction of bioactive plants. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 37-44, 2012.

RAJDEO, K.; HARINI, T.; LAVANYA, K.; FADNAVIS, N. W. Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice. **Food and bioproducts processing**, v. 99, p. 12-19, 2016.

RAJU, E.V.N.; DIVAKAR, G. Production of pectinase using *Bacillus circulans* isolated from plant waste dumps. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v. 4, n. 7, p. 2615, 2013.

RAPP, P.; BACKHAUS, S.; Formation of cellular lipases by filamentous fungi, yeasts, and bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**. Vol 14, p. 938-943, 1992.

REBELLO, S.; ANJU, M.; ANEESH, E.M.; SINDHU, R.; BINOD, P.; PANDEY, A. Recent advances in the production and application of microbial pectinases: an overview. **Reviews in environmental science and biotechnology**. v. 16, n. 3, p. 381-394, 2017.

REETHA, S.; SELVAKUMAR, G.; BHUVANESWARI, G.; THAMIZHINIYAN, P.; RAVIMYCIN, T. Screening of cellulase and pectinase by using *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. **International Letters of Natural Sciences**, v. 8, n. 2, 2014.

REHMAN, H.U.; SIDDIQUE, N.N.; AMAN, A.; NAWAZ, M.A.; BALOCH, A.H.; QADER, S.A.U. Identification of morphological and molecular basis of *Bacillus licheniformis* producing pectinase from rotten vegetables. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v. 13, n. 2, p. 139-144, 2015.

REZAEI, A.; FATHI, M.; JAFARI, S.M. Nanoencapsulation of bioactive compounds from hydrophobic and poorly soluble foods in different nanocarriers. **Food hydrocolloids**. v. 88, p. 146-162, 2019.

RIBEIRO, G.D.; FERREIRA, M. das G.R. Comportamento inicial de duas fruteiras amazônicas e duas exóticas tropicais, em Porto Velho, Rondônia: abiu gigante (*Pouteria caimito* (Ruiz & Pav.) Radlk), araçá-boi (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh.), abricó (*Mammea americana* Jacq.) e rambutan (*Nephelium lappaceum* L.). Porto Velho: **Embrapa Rondônia**. 2008.

RIED, J.L.; COLLMER, A. Comparison of pectic enzymes produced by *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 52, n. 2, pág. 305-310, 1986.

RODRIGUES, D. A.; DE SOUSA, B. L.; DA SILVA, J. G.; PEREIRA, G. A.; BOUSADA, G. M.; DA SILVA, A. A.; DOS SANTOS, M. H. Phytotoxic property of metabolites isolated from *Garcinia gardneriana*. **Computational Biology and Chemistry**, v. 92, p. 107460, 2021.

RODRIGUES, H.C.; CARVALHO, A.L.; SOUZA, C.O.; UMSZA-GUEZ, M.A. Evolution of the World and Brazilian Markets for Enzymes Produced by Solid State Fermentation: A Patent Analysis. **Recent Biotechnology Patents**, v. 14, n. 2, p. 112-120, 2020.

RODRÍGUEZ, L. G. R.; MOHAMED, F.; BLECKWEDEL, J.; MEDINA, R.; DE VUYST, L.; HEBERT, E. M.; MOZZI, F. Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. *Front. Microbiol.* v.10, p. 1091, 2019.

RODRIGUEZ, P.; GONZALEZ, D. E.; GIORDANO, S.R. Endophytic microorganisms: A source of potentially useful biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. S569-S581, 2016.

RÓGEZ, H.; BUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **European Food Research and Technology**. v.218, p.380-384, 2004.

ROJAS-GARBANZO, C.; PÉREZ, A. M.; BUSTOS-CARMONA, J.; VAILLANT, F. Identification and quantification of carotenoids by HPLC-DAD during the process of peach palm (*Bactris gasipaes* HBK) flour. **Food Research International**, 44, 2377-2384, 2011.

ROKADE, D. D.; VAIDYA, S. L.; REHMANNAZIYA, M. A.; DIXIT, P. P. Screening of pectinase producing bacteria, isolated from Osmanabad fruit market soil. **Int. J. Interdiscip. Multidiscip. Stud**, v. 2, p. 141-145, 2015.

ROLLER, S.; ZIETSMAN, A.J.; BUFFETTO, F.; SCHÜCKEL, J.; ORTIZ-JULIEN, A.; DIVOL, B. Kluyveromyces marxianus secretes a pectinase in Shiraz grape must that affects the technological properties and aromatic profile of the wine. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 66, n. 44, pg. 11739-11747, 2018.

ROMERO-CASCALES, I.; ROS-GARCÍA, J.M.; LÓPEZ-ROCA, J.M.; GÓMEZ-PLAZA, E.O. The effect of a commercial pectolytic enzyme on grape skin cell wall degradation and color evolution during the maceration process. **Food Chemistry**. v. 130, n. 3, p. 626-631, 2012.

ROY, K.; DEY, S.; UDDIN, M.; BARUA, R.; HOSSAIN, M. Extracellular pectinase from a new bacterium Chryseobacterium indologenes strain SD and its application in the clarification of fruit juices. **Enzyme Research**. vol. 2018, 2018.

SAADOUN, I.; DAWAGREH, A.; JARADAT, Z.; ABABNEH, Q. Influence of culture conditions on pectinase production by Streptomyces sp. (strain J9). **International Journal of Life-Sciences Scientific Research**. v. 3, p. 148, 2013.

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

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E.J. Properties and

Applications. **Advances in applied microbiology**, v. 39, p. 213-294, 1993.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, MANIATIS, T.; Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. **Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.** 1989.

SAMOTICHA, J.; WOJDYŁO, A.; CHMIELEWSKA, J.; POLITOWICZ, J.; SZUMNY, A. Effects of enzymatic pretreatment and yeast type on the chemical properties of white wine. **LWT-Food Science and Technology**, v. 79, p. 445-453, 2017.

SANDRI, I.G.; SILVEIRA, M.M.D. Production and application of *Aspergillus niger* pectinases obtained in solid state culture. **Drinks**. v. 4, n. 3, p. 48, 2018.

SANOMIYA, L.T.; NAHAS, E. Hydrolases-producing microorganisms involved in the transformation of soil carbon and nitrogen compounds. **Rural Science**.vol. 33, n. 5, p. 835-842, 2003.

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

SANTOS, M.F.G.; ALVES, R.E.; ROCA, M. Composition of carotenoids in oils obtained from palm fruits from the Brazilian Amazon. 2015.

SANTOS, M. D. F. G. D. Qualidade e potencial funcional da porção comestível e do óleo de frutos de palmeiras nativas oriundas do Amapá. 2012.

SANTOS, M.D.F.G.D.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.D.; SILVA, S.D.M.; SILVEIRA, M.R.S.D. Quality characteristics of fruits and oils of palms native to the Brazilian Amazon. **Brazilian Journal of Fruticulture**. v. 39, 2017.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian journal of microbiology**. v. 50, n. 1, p. 1-17, 2004.

SCHELLER, H. V., JENSEN, J. K., SORESENSEN, S. O., HARHOLT, J., GESHI, N. Biosynthesis of pectin. *Physiologia Plantarum*, v. 129, p. 283-295, 2007.

SCHNEIDER, L.C.; LEÃO, K.V.; MACHADO, L.L.; GUIMARÃES, A.R.D. Physical and fruit characterization of bacupari, *Salacia Crassifolia* (Mart. ex Schult.) G. Don, from Barreiras-BA. **Brazilian Development Magazine**. v. 6, n. 3, p. 13942-13953, 2020.

SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. Editora Manole: São Paulo, 1985. 498 p.

SHARMA, A.; SOGI, D.S. Otimização da extração de pigmento auxiliado por enzimas de abóbora (*Cucurbita maxima* Duch) usando metodologia de superfície de resposta. **Journal of Food Measurement and Characterization**, p. 1-11, 2022.

SHARMA, D.C.; SATYANARAYANA, T. Thermostable and alkaline exopolysaccharidase from *Bacillus pumilus* dcsr1: Characteristics and applicability. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 164, p. 3340-3348, 2020.

SHARMA, H.P.; PATEL, H.; SUGANDHA. Added enzyme extraction and clarification of fruit juices – A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 57, n. 6, p. 1215-1227, 2017.

SHELDON, R.A.; VAN PELT, S. Enzymatic immobilization in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**. v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.

SHEVCHIK, V.E.; CONDEMIN, G.; ROBERT-BAUDOUY, J.; HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. Exopolygalacturonate lyase PelW and oligogalacturonate lyase Ogl, two cytoplasmic enzymes of pectin catabolism in *Erwinia chrysanthemi* 3937. **Journal of bacteriology**. v. 181, n. 13, p. 3912-3919, 1999.

SHRESTHA, S.; KHATIWADA, J.R.; ZHANG, X.; CHIO, C.; KOGNOU, A.L.M.; CHEN, F.; QIN, W. Molecular Screening and Identification of New Pectinolytic Bacteria from Forest Soil. **Fermentation**. vol. 7, n. 1, p. 40, 2021.

SILVA, C. A. A.; FONSECA, G. G. Brazilian savannah fruits: Characteristics, properties, and potential applications. **Food science and biotechnology**. v. 25, n. 5, p. 1225-1232, 2016.
SILVA, E. G.; BORGES, M. F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R. H.; SCHWAN, R. F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 859–865, 2005.

SILVA, L.M.M.; SOUZA, F.C.; CASTRO, D.S.; NUNES, J.S.; ALMEIDA, F.A.C. Evaluation of the physical and physical-chemical characteristics of peach palm. **Revista Verde, Pombal**. v.8, n.3, p.5-8, 2013.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P.K. Microbial enzymes: industrial progress in the 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1-15, 2016.

SNELL-CASTRO, R.; GODON J. J.; DELGENÈS, J. P.; DABERT P.; Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis. **FEMS Microbiol Ecol**, p. 229-242, 2005.

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

SOHAIL, M.; LATIF, Z. Phylogenetic analysis of polygalacturonase-producing *Bacillus* and *Pseudomonas* isolated from plant residues. **Jundishapur Journal of Microbiology**. v. 9, n. 1, 2016.

SOJITRA, U.V.; NADAR, S.S.; RATHOD, V.K. Magnetic nanobiocatalyst of three enzymes for fruit juice clarification. **Food Chemistry**. v. 213, p. 296-305, 2016.

SONG, H.C.; QIN, D.; HAN, M.J.; WANG, L.; ZHANG, K.; DONG, J.Y. Bioactive 2-pyrone metabolites from an endophytic SWUKJ5 from *Phomopsis asparagi*. 2020 of *Kadsura angustifolia*. **Phytochemistry Letters**, v. 22, p. 235-240, 2017.

SOUZA, P.A. DE; LORD, R.F.; COSTA, F.B. GIVES; FREITAS, R.V. of S.; SILVA, M.S.

Physicochemical characterization of bilimbí (*Averrhoa bilimbi* L.) fruits produced in the state of RN. **Revista Verde**, v.6, p.270-273, 2011.

SOWBHAGYA, H.B.; CHITRA, V.N. Enzyme-assisted extraction of aromas and dyes from plant materials. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 50, n. 2, p. 146-161, 2010.

STRATI, I.F.; GOGOU, E.; OREOPOULOU, V. High pressure, enzyme-assisted extraction of carotenoids from tomato residues. **Food Processing and Bioproducts**. v. 94, p. 668-674, 2015.

SUN-WATERHOUSE, D. The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 46, n. 5, p. 899-920, 2011.

SUTO, M.; TAKEBAYASHI, M.; SAITO, K.; TANAKA, M.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. Endophytes as xylanase producers. **Journal of bioscience and bioengineering**. v. 93, n. 1, p. 88-90, 2002.

TABSSUM, F.; ALI, S. S. Screening of Pectinase Producing Gram Positive Bacteria: Isolation and Characterization. **Punjab University Journal of Zoology**, v. 33, n. 1, p. 11-15, 2018.

TEN, L.N.; IM, W.T.; KIM, M.K.; KANG, M.S.; LEE, S.T. Development of a plate technique for screening polysaccharide-degrading microorganisms by using of insoluble chromogenic substrates. **Journal of Microbiological Methods**. v.56, p.375-382, 2004.

TEPE, O.; DURSUN, A.Y. Exopectinase production by *Bacillus pumilus* using different agricultural residues and optimization of medium components using response surface methodology. **Research in Environmental Science and Pollution**. v. 21, n. 16, p. 9911-9920, 2014.

TORIMIRO, N.; ADEDIWURA, V.A.; OJO, S.T.; OLUWADARE, A.O.; OKONJI, R.E. Pectinolytic activities of pectinase produced by some bacterial isolates cultivated from spoiling fruits. **Nigeria's Journal of Biotechnology**. v. 35, n. 2, p. 91-98, 2018.

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

TRINDADE, R. C.; RESENDE, M. A.; SILVA, C. M.; ROSA, C. A. Yeasts associated with fresh and frozen pulps of Brazilian tropical fruits. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 25, n. 2, p. 294-300, 2002.

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

ULLAH, S.; IRFAN, M.; SAJJAD, W.; RANA, QUA, Hasan, F.; Khan, S.; Ali Shah, A. Production of an alkali-stable xylanase from *Bacillus pumilus* K22 and its application in clarifying tomato juice. **Food Biotechnology**. v. 33, n. 4, p. 353-372, 2019.

UZUNER, S.; AND CEKMECELIOGLU, D. Optimizing the clarification of carrot juice by gross bacterial pectinase. **International Journal of Food Science & Technology**. v. 50, n. 12, p. 2707-2712. 2015.

UZUNER, S.; CEKMECELIOGLU, D. Biochemical characterization and stability of *Bacillus subtilis* polygalacturonase produced with hazelnut shell by submerged fermentation. **Biocatalysis and Biotransformation**, p. 1-6, 2021.

VALENCIA, G.A.; MORAES, I.C.F.; LOURENÇO, R.V.; BITTANTE, A.M.Q.B.; SOBRAL, P.J.D.A. Physicochemical, morphological and functional properties of peach palmfruit (*Bactris gasipaes* K.) flour and starch. **Starch-Stärke**. v. 67, n. 1-2, p. 163-173, 2015.

VALLS, C.; PUJADAS, G.; GARCIA-VALLVE, S.; MULERO, M. Protease activity characterization of practical laboratory detergents to study the protease profile and activity of several commercial detergents. **Education in Biochemistry and Molecular Biology**. v. 39, n. 4, p. 280-290, 2011.

VAN RENSBERG, P.; PRETORIUS, I.S. Enzymes in Winemaking: Harnessing Natural Catalysts for Efficient Biotransformations-A Review. **South African Journal of Enology and Viticulture**. v. 21, n. 1, p. 52-73, 2000.

VASCO-CORREA, J.; ZAPATA, A.D.Z. Enzymatic extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) on laboratory and bench scale. **LWT**. v. 80, p. 280-285, 2017.

VASCONCELOS, W. E.; RIOS, M. S.; SOUSA, A. H.; MEDEIROS, E. V.; SILVA, G. M. C.; MARACAJÁ, P. B. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v.3, 2003.

VELOSO, C.D.C.; SILVA, M.B.D.; MEGDA, M.D.O.; SANTOS, M.H.D.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F.C. Evaluation of the anxiolytic effect of 7-epiclusianone isolated from *Garcinia brasiliensis* in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 28, p. 378-381, 2018.

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

VIVEK, K.; MISHRA, S.; PRADHAN, R.C. Optimization of ultrasound-assisted enzymatic extraction of Sohiong (*Prunus nepalensis*) juice. **Journal of Food Process Engineering**. v. 42, n. 1, p. 12948, 2019.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbiology Genetics Bulletin**, vol. 13, p. 42-43, 1956.

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, n. 2, p. 263-275, 2009.

VUPPU, S.; MISHRA, M. An overview of some soil enzyme producing microorganisms.

Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences, v. 1, no. 4, p. 180-86, 2011.

XIA, J. L.; LI, P. J. Pectic Enzymes. **In Reference Module in Food Science**; Elsevier: Amsterdam, the Netherlands, 2018.

ZAPATA-ZAPATA, A.D.; HORAS, R.A.; CAVALITTO, S.F. Protopectinase from *Geotrichum klebahnii*: Studies of the adsorption and solubilization capacity of pectin. **Dyna**, v. 84, n. 201, p. 216-223, 2017.

ZARE, M.; NOROUZI ROSHAN, Z.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S.M. Improving the role of carotenoids in cancer prevention/treatment through various nano-delivery systems. **Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 61, n. 3, p. 522-534, 2021.

ZHANG, J.; ZHAO, L.; GAO, B.; WEI, W.; WANG, H.; XIE, J. Protopectinase production by *Paenibacillus polymyxa* Z6 and its application in the extraction of pectin from apple pomace. **Food Processing and Preservation Magazine**. v. 42, n. 1, p. 13367, 2018.

ZHENG, Y.X.; WANG, Y.L.; PAN, J.; ZHANG, J.R.; DAI, Y.; CHEN, K. Y. Semi-continuous production of high-activity pectinases by immobilized *Rhizopus oryzae* using tobacco wastewater as substrate and their utilization in the hydrolysis of pectin-containing lignocellulosic biomass at high solid content. **Bioresource technology**. v. 241, p. 1138-1144, 2017.

ZHONG, L.; WANG, X.; FAN, L.; Y.E.; X.; LI, Z.; CUI, Z.; HUANG, Y. Characterization of a pectin acid methylsterase from *Paenibacillus xylanexedens* and its application in fruit processing. **Protein Expression and Purification**. v. 179, p. 105798, 2021.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N.B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D., HIGLEY, P.; VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, n. 5, p. 2198-2208, 2002.

ZOU, M.; GUO, F.; LI, X.; ZHAO, J.; QU, Y. Aumento da produção de poligalacturonato liase alcalino de *Bacillus subtilis* por fermentação descontínua. **Plos um**, v. 9, n. 3, pág. 90392, 2014.

WILLATS, W.G.; LIMBERG, G.; BUCHHOLT, HC, VAN ALEBEEK, G.J.; BENEN, J.; CHRISTENSEN, T.M.; KNOX, J.P. Analysis of pectic epitopes recognized by hybridoma and phage displays monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides and enzymatic degradation. **Carbohydrate Research**. v. 327, n. 3, p. 309-320, 2000.